

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

---

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
ANTIMUTAGÊNICO DE EXTRATO ETANÓLICO  
DE PRÓPOLIS VERDE E DE *Baccharis  
dracunculifolia* (Asteraceae), POR MEIO DE  
SISTEMA-TESTE DE *Allium cepa* E CÉLULAS  
DE MAMÍFEROS (HTC)**

**MATHEUS MANTUANELLI ROBERTO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Julho - 2009

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
ANTIMUTAGÊNICO DE EXTRATO ETANÓLICO  
DE PRÓPOLIS VERDE E DE *Baccharis  
dracunculifolia* (Asteraceae), POR MEIO DE  
SISTEMA-TESTE DE *Allium cepa* E CÉLULAS  
DE MAMÍFEROS (HTC)**

**MATHEUS MANTUANELLI ROBERTO**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Marin-Morales

Co-orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências do Campus  
de Rio Claro, Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre  
em Ciências Biológicas (Biologia  
Celular e Molecular).

Rio Claro – SP

Julho/2009

574.87 Roberto, Matheus Mantuanelli  
R639a Avaliação do potencial antimutagênico de extrato etanólico de própolis verde e de Baccharis dracunculifolia (Asteraceae), por meio de sistema-teste de Allium cepa e células de mamíferos (HTC) / Matheus Mantuanelli Roberto. -Rio Claro : [s.n.], 2009  
116 f. : il., gráfs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Maria Aparecida Marin Morales  
Co-orientador: Osmar Malaspina

1. Citologia. 2. Antimutagênese. 3. Alecrim-do-campo. 4. Aberrações cromossômicas. 5. Micronúcleo. 6. Ensaio do cometa. I. Título

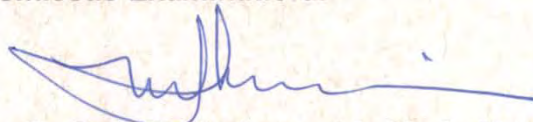
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO defendida em 24/07/2009**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO DE EXTRATO ETANÓLICO  
DE PRÓPOLIS VERDE E DE BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA  
(ASTERACEAE), POR MEIO DE SISTEMA-TESTE DE ALLIUM E CÉLULAS DE  
MAMÍFEROS (HTC)**

**MATHEUS MANTUANELLI ROBERTO**

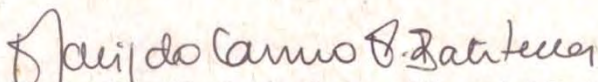
**Comissão Examinadora:**



**Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales**



**Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti**



**Profa. Dra. Maria do Carmo Pimentel Batitucci**

*“Dedico este trabalho aos meus pais,  
Francisco e Arlete, aos meus irmãos,  
Danilo e Mariana, e à minha namorada,  
Glei.”*



Adaptado de [WWW.PHDCOMICS.COM](http://WWW.PHDCOMICS.COM)  
Publicado em 04/11/2007.

## AGRADECIMENTOS

Sou grato:

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo financiamento concedido.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Marin-Morales, pela orientação neste trabalho, pelo apoio, incentivo e confiança depositados em mim. Agradeço a esta pessoa incrível que é um exemplo de professora e pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina, pela co-orientação e colaboração. Agradeço pelo fornecimento das amostras de própolis e do alecrim-do-campo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Tamie Matsumoto, pela contribuição neste trabalho, por se tornar uma amiga e por ceder sua casa, seu tempo e paciência durante minha estadia na Universidade Federal do Espírito Santo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, pela colaboração e pelas valiosas correções e sugestões.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dejanira de Franceschi de Angelis pela disponibilização dos equipamentos dos laboratórios.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Masrouah Jamal, pela colaboração, pelas sugestões e pelas análises químicas prestadas.

À Sandra Veloso, técnica do Laboratório de Mutagênese, pela ajuda nas diversas atividades laboratoriais, pelo incentivo, apoio e conselhos.

Ao Gerson Souza, técnico do Laboratório de Histologia, pela ajuda.

À Olívia Maria Costa de Souza e Silva, técnica do CEIS, pelos auxílios durante a obtenção dos extratos.

Ao Apiário Floresta Comércio Importação e Exportação Ltda., pelo fornecimento das amostras de própolis e alecrim-do-campo.

À Bárbara, Dani, Dânia, Jaqueline, Márcia, Tati e Thaís, pela ajuda com o experimento de cultura de células e com o ensaio do cometa.

Aos colegas do Laboratório de Mutagênese: Bárbara, Bruna, Cintya, Cris, Dani, Dânia, Davi, Jana, Jaque, Márcia, Nádia, Renata, Tati, Thaís, pela amizade e por fazerem parte deste grupo trabalhador e unido. Aos agregados, Reinaldo e Thiago, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Ao pessoal do Laboratório de Mutagênese *in vivo* e *in vitro*, da UFES, Maressa, Mariana, Marina e Thati, pela grande ajuda prestada durante a realização dos meus experimentos, em pleno feriado de carnaval.

Em especial, à minha família:

Aos meus pais, Francisco e Arlete, pelo amor e carinho. Às pessoas que sempre se dedicaram à minha formação e desenvolvimento, incentivando e aconselhando.

Aos meus irmãos, Danilo e Mariana, pela amizade e incentivo.

À minha namorada, Gleí, pelo amor e amizade. Por estar sempre ao meu lado, pelo seu amor, por sua confiança, por ser uma grande namorada e amiga.

À Belinha, pela amizade e alegria.

Aos amigos da república 3 e ½, Rafael e Sunao, pela amizade, pelos conselhos e pelos bons momentos de conversa durante algumas xícaras de café.

## RESUMO

O consumo de produtos apícolas tem atraído o interesse da população devido à prática de medicinas naturais. As abelhas coletam substâncias e fragmentos de origem vegetal para produzirem a própolis, que é utilizada para selar e proteger a colméia contra invasões de microrganismos patogênicos. O homem utiliza a própolis desde a antiguidade e para fins diversos. Por meio de extensivos estudos, hoje se sabe que existem tipos específicos de própolis, que variam entre as regiões geográficas e a fonte botânica e, portanto, apresentam composições químicas também específicas. A própolis do tipo verde, que ganhou, recentemente, destaque internacional pela sua alta e variada constituição de flavonóides, tem como fonte botânica a planta *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), popularmente conhecida como alecrim-do-campo. Atualmente, extratos etanólicos de produtos naturais, como da própolis verde, vêm se destacando pelas suas propriedades terapêuticas. Neste trabalho foi avaliado o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico, mas, principalmente, foi verificada a possível atividade anticitotóxica, antigenotóxica e antimutagênica destes extratos etanólicos, sobre sistemas-teste de *Allium cepa* (cebola) e células de hepatoma de rato (HTC), mantidas em cultura. A verificação do índice mitótico, de células meristemáticas de *A. cepa*, não serviu de parâmetro para avaliar citotoxicidade e anticitotoxicidade. As análises da frequência de aberrações cromossômicas e da frequência de micronúcleos (MN) revelaram que, ambos os extratos, não foram genotóxicos e nem mutagênicos para as células meristemáticas de *A. cepa*. Também não houve indução significativa de MN para as células F<sub>1</sub> de cebola e para as células HTC mantidas em cultura. O ensaio do cometa, realizado com as células HTC, indicou a ausência de ação genotóxica para os extratos testados neste trabalho. O pré-tratamento realizado em células de *A. cepa* mostrou que os extratos foram capazes de reduzir a indução de danos citogenéticos promovidos pelo Metilmetano Sulfonato (MMS), para as células meristemáticas e as F<sub>1</sub>. O tratamento simultâneo, feito com amostras pré-incubadas, aplicadas em células HTC demonstrou redução significativa na frequência de MN. Pelos resultados obtidos, podemos inferir que os extratos etanólicos da própolis verde e de *Baccharis dracunculifolia* são capazes de reduzir a indução de danos, promovidos por agentes genotóxicos e mutagênicos, sobre o material genético de células de *Allium cepa* e de células HTC.

## ABSTRACT

Consumption of apicultural products has attracted the interest of the population due to the practice of natural medicine. Bees collect substances and fragments of vegetal origin to produce propolis, which is used to seal and protect the beehive against pathogenic microorganisms. Human beings use the propolis since the antiquity and for several purposes. By extensive studies, nowadays it is known that there are specific types of propolis, which vary between geographic regions and botanical sources and, therefore, present specific chemical compositions. The Brazilian green propolis, which has recently received international prominence, has as botanical source the plant *Braccharis dracunculifolia* (Asteraceae), popularly known as alecrim-do-campo. Currently, ethanolic extracts of natural products, eg made with green propolis, have been highlighted for their therapeutical properties. In the present work, the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials were evaluated, but, mainly, it was verified the possible anticytotoxic, antigenotoxic and antimutagenic activities of these ethanolic extracts in the *Allium cepa* (onion) test system and in HTC (hepatoma tissue culture) cells maintained in culture. The verification of the mitotic index, of meristematis cells of *A. cepa*, did not serve as parameter to evaluate cytotoxicity and anticytotoxicity. The analyses of chromosomal aberrations (AC) and micronuclei (MN) frequencies revealed that, both extracts, were not genotoxic nor mutagenic for meristematis cells of *A. cepa*. Also, there was no significant induction of MN in onion F<sub>1</sub> cells and HTC cells. The comet assay, carried out with HTC cells, indicated absence of genotoxic action for the extracts tested in this work. The pre-treatment carried out with cells of *A. cepa* showed that the extracts were capable to reduce the induction of cytogenetics damages promoted by Methyl Methane Sulfonate (MMS), for meristematic cells and F<sub>1</sub> cells. The simultaneous treatment, performed with pre-incubated samples and applied in HTC cells, demonstrated significant reduction in the MN frequency. By the obtained results, we can infer that ethanolic extracts of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* are capable to reduce the induction of damages, promoted by genotoxic and/or mutagenic agents, in the genetic material of *Allium cepa* and HTC cells.

## LISTA DE ABREVIações

|                |                                                                              |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------|
| AC             | Aberrações Cromossômicas                                                     |
| CCD            | Cromatografia em camada delgada                                              |
| CHO            | <i>Chinese Hamster Ovary cells</i> ou células de ovário de hamster chinês    |
| CN             | Controle Negativo                                                            |
| CP             | Controle Positivo                                                            |
| CS             | Controle do Solvente                                                         |
| DMSO           | Dimetilsulfóxido                                                             |
| DP             | Desvio padrão                                                                |
| EDTA           | <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> ou ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EEBD           | Extrato etanólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i>                        |
| EEPV           | Extrato etanólico de própolis verde                                          |
| HMB            | <i>Human melanoma Black cells</i> ou células de melanoma humano              |
| HTC            | <i>Hepatoma Tissue Culture</i> ou cultura celular de hepatoma                |
| IM             | Índice Mitótico                                                              |
| MMS            | Metilmetano Sulfonato                                                        |
| MN             | Micronúcleo                                                                  |
| PBS            | <i>Phosphate Buffered Saline</i> ou tampão fosfato                           |
| R <sub>f</sub> | Fator de retenção                                                            |
| RNS            | <i>Reactive Nitrogen Species</i> ou Espécies reativas de nitrogênio          |
| ROS            | <i>Reactive Oxygen Species</i> ou Espécies reativas de oxigênio              |
| SAR            | <i>Structure-activity Relationships</i> ou relação estrutura-atividade       |
| SOD            | Superóxido desmutase                                                         |
| TMNBC          | Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese                              |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA</b>                                                                                                                                                 | <b>1</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                                                                                                                       | <b>4</b>  |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                                                                                                                                                           | <b>5</b>  |
| 3.1. Própolis                                                                                                                                                                             | 5         |
| 3.1.1. Histórico                                                                                                                                                                          | 5         |
| 3.1.2. Importância econômica                                                                                                                                                              | 6         |
| 3.1.3. Origem e composição química                                                                                                                                                        | 7         |
| 3.1.4. Propriedades biológicas e farmacológicas                                                                                                                                           | 9         |
| 3.2. Sistema-teste de <i>Allium cepa</i>                                                                                                                                                  | 11        |
| 3.2.1. Aberrações cromossômicas                                                                                                                                                           | 12        |
| 3.3. Cultura de células de mamíferos (HTC)                                                                                                                                                | 13        |
| 3.3.1. Teste do micronúcleo (MN)                                                                                                                                                          | 14        |
| 3.3.2. Ensaio do cometa                                                                                                                                                                   | 15        |
| <b>4. RESULTADOS</b>                                                                                                                                                                      | <b>17</b> |
| <b>Ação antioxidante dos flavonóides – Uma revisão</b>                                                                                                                                    | <b>18</b> |
| 1. Introdução                                                                                                                                                                             | 19        |
| 2. Conclusão                                                                                                                                                                              | 32        |
| 3. Agradecimentos                                                                                                                                                                         | 33        |
| 4. Referências                                                                                                                                                                            | 33        |
| <b>Avaliação do potencial antimutagênico de extratos etanólicos da própolis verde e de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (Asteraceae), por meio de sistema-teste de <i>Allium cepa</i></b> | <b>41</b> |
| 1. Introdução                                                                                                                                                                             | 42        |
| 2. Materiais e métodos                                                                                                                                                                    | 45        |
| 2.1. Origem da própolis e sua fonte botânica                                                                                                                                              | 45        |
| 2.2. Preparação do extrato etanólico da própolis (EEPV)                                                                                                                                   | 45        |
| 2.3. Preparação do extrato etanólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (EEBD)                                                                                                           | 45        |
| 2.4. Caracterização fitoquímica dos extratos etanólicos                                                                                                                                   | 46        |
| 2.5. Determinação da quantidade total de flavonóides dos extratos etanólicos                                                                                                              | 46        |
| 2.6. Cromatografia em camada delgada (CCD)                                                                                                                                                | 46        |
| 2.7. Determinação de sólidos solúveis totais                                                                                                                                              | 47        |
| 2.8. Determinação do efeito antimutagênico                                                                                                                                                | 47        |
| 2.9. Sistema-teste de <i>Allium cepa</i>                                                                                                                                                  | 49        |
| 3. Resultados                                                                                                                                                                             | 49        |
| 3.1. Determinação da quantidade total de flavonóides dos extratos etanólicos                                                                                                              | 49        |
| 3.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)                                                                                                                                                | 50        |
| 3.3. Determinação dos sólidos solúveis totais                                                                                                                                             | 51        |
| 3.4. Tratamento com os extratos etanólicos                                                                                                                                                | 51        |
| 3.5. Tratamento com o agente mutagênico                                                                                                                                                   | 53        |
| 3.6. Ensaio de recuperação                                                                                                                                                                | 56        |
| 4. Discussão                                                                                                                                                                              | 59        |

|                                                                                                                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5. Conclusão.....                                                                                                                                               | 64        |
| 6. Referências.....                                                                                                                                             | 64        |
| <b>Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extrato de própolis e de sua fonte botânica, por meio de testes com células HTC mantidas em cultura.</b> | <b>71</b> |
| 1. Introdução.....                                                                                                                                              | 73        |
| 2. Materiais e métodos.....                                                                                                                                     | 74        |
| 2.1. Origem da própolis e sua fonte botânica.....                                                                                                               | 74        |
| 2.2. Preparação do extrato etanólico da própolis (EEPV) .....                                                                                                   | 75        |
| 2.3. Preparação do extrato etanólico de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (EEBD) .....                                                                           | 75        |
| 2.4. Caracterização fitoquímica dos extratos etanólicos .....                                                                                                   | 75        |
| 2.5. Determinação da quantidade total de flavonóides dos extratos etanólicos .....                                                                              | 76        |
| 2.6. Cromatografia em camada delgada (CCD) .....                                                                                                                | 76        |
| 2.7. Determinação de sólidos solúveis totais .....                                                                                                              | 76        |
| 2.8. Cultura de células de mamíferos (HTC) .....                                                                                                                | 76        |
| 2.9. Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese (TMNBC).....                                                                                               | 77        |
| 2.10. Ensaio do cometa.....                                                                                                                                     | 78        |
| 2.11. Determinação do efeito antimutagênico .....                                                                                                               | 80        |
| 3. Resultados.....                                                                                                                                              | 80        |
| 3.1. Determinação da quantidade total de flavonóides dos extratos etanólicos .....                                                                              | 80        |
| 3.2. Cromatografia em camada delgada (CCD) .....                                                                                                                | 81        |
| 3.3. Determinação dos sólidos solúveis totais.....                                                                                                              | 81        |
| 3.4. Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese (TMNBC).....                                                                                               | 81        |
| 3.5. Ensaio do cometa.....                                                                                                                                      | 82        |
| 4. Discussão .....                                                                                                                                              | 83        |
| 5. Conclusão.....                                                                                                                                               | 87        |
| 6. Referências.....                                                                                                                                             | 87        |
| <b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>                                                                                                                            | <b>92</b> |
| <b>6. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>                                                                                                                               | <b>94</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS GERAIS .....</b>                                                                                                                              | <b>96</b> |

## 1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

---

Muitas substâncias químicas apresentam afinidade de ligação com o material genético de organismos vivos. Dentre as substâncias que interagem com os ácidos nucléicos, algumas se comportam como agentes que promovem alterações ou danos na fita de DNA, sendo chamados de agentes genotóxicos ou mutagênicos. No entanto, alguns compostos podem interagir com o material genético das células, promovendo uma atividade antimutagênica, ou seja, atuando como protetor da molécula de DNA (BOER; HOEIJMAKERS, 2000).

Atualmente, devido a identificação de uma grande quantidade de substâncias com atividade antimutagênica e anticarcinogênica, acredita-se que seja possível prevenir ou proteger, por meios químicos, os organismos contra a indução de danos genéticos, como também de doenças relacionadas às alterações promovidas nas células (DOLL, 1992). Knasmüller et al. (2002) informam que já foram publicados nos últimos 20 anos, aproximadamente, 25.000 artigos científicos sobre antimutagênese e anticarcinogênese. Segundo estes autores, dentre as substâncias descritas com potencialidade antimutagênica e anticarcinogênica, 80% ou estão presentes em vegetais consumidos na dieta ou são ingeridos com propósitos medicinais.

O uso de alimentos naturais, ou de seus compostos ativos, para fins preventivos de doenças crônicas, baseia-se nas práticas de medicina tradicional de vários grupos étnicos, obtidas de dados epidemiológicos dos hábitos alimentares e dos padrões de doenças (RAO et al., 1995).

A prática de medicina alternativa tem atraído um interesse cada vez maior em produtos apícolas, como o mel, geléia real e própolis. Particularmente, este último produto vem se destacando por suas propriedades terapêuticas, assim como pela aplicação nas indústrias farmacêuticas e no setor alimentício, na forma de alimentos caracterizados como funcionais (PARK et al., 1998).

A própolis é uma substância resinosa elaborada pelas abelhas a partir de diversos fragmentos vegetais (MARCUCCI, 1995). As abelhas adicionam enzimas salivares à composição da própolis e este material, parcialmente digerido, é misturado com cera e usado na constituição da colméia (BANKOVA et al., 2000).

A forma mais comum de comercialização da própolis é em extratos alcoólicos, mas, atualmente, diversos produtos derivados deste composto são comercializados no mundo todo, com destaque especial ao Japão (PARK et al., 1998).

O Brasil, pela grande área natural e agrícola que possui, caracteriza-se em um ambiente adequado para a exploração de recursos vegetais por abelhas produtoras de mel e seus derivados.

Recentemente, foram coletadas amostras de própolis em todas as regiões do Brasil (exceto região norte), onde foi possível identificar, de acordo com a região de coleta e origem botânica, 12 diferentes tipos de própolis (PARK et al., 2000). A própolis considerada como do grupo 12, conhecida internacionalmente como própolis verde, vem sendo bastante procurada pelo comércio japonês, por ser considerada de excelente qualidade química (MARCUCCI et al., 2001). Este tipo de própolis é produzido pelas abelhas, a partir de brotos e folhas jovens de uma planta de cerrado, encontrada abundantemente no norte do estado de São Paulo e sul do estado de Minas Gerais, identificada como *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), popularmente conhecida como alecrim-do-campo ou vassourinha (KUMAZAWA et al., 2003).

Embora a própolis seja muito utilizada na medicina alternativa e como preventiva de doenças, pelas propriedades biológicas que possui, poucos estudos foram realizados para avaliar os seus efeitos mutagênicos e antimutagênicos sobre diferentes organismos eucariontes (BURDOCK, 1998). Contudo, alguns trabalhos científicos registram efeito antioxidante para este produto, como o estudo realizado por Kumazawa et al. (2004).

Neste contexto, devido à importância das propriedades biológicas dos produtos apícolas, somado à constante busca por substâncias naturais capazes de

minimizar os efeitos prejudiciais de químicos diversos sobre o DNA dos organismos, este estudo teve como objetivo avaliar a utilização dos extratos etanólicos da própolis verde e de *B. dracunculifolia* como compostos protetores do material genético.

## 2. OBJETIVOS

---

O presente trabalho teve por objetivo geral investigar as potencialidades anticitotóxicas, antigenotóxicas e antimutagênicas do extrato etanólico da própolis, especificamente do tipo verde, e do extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e de ensaios com células de mamíferos mantidas em cultura (HTC).

Objetivos específicos:

- Investigar as potencialidades anticitotóxicas, antigenotóxicas e antimutagênicas, e as atividades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas do extrato etanólico da própolis verde (EPPV) e do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* (EEBD), espécie botânica relacionada com a produção da referida própolis, por meio de dois sistemas-teste diferentes (*A. cepa* e células HTC);
- Estimar a possível proteção celular do EPPV e do EEBD em um reconhecido sistema-teste vegetal (*A. cepa*), por meio de testes de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células meristemáticas, e a indução de micronúcleos em células F<sub>1</sub> deste organismo;
- Estimar a possível ação protetora do EPPV e do EEBD em células de mamíferos mantidas em cultura (HTC), pelo teste do micronúcleo e do ensaio do cometa;
- Avaliar, comparativamente, as respostas dos diferentes sistemas-teste, para a certificação da potencialidade do uso do sistema de *A. cepa* como sistema-teste aplicável em testes de antimutagenicidade.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 3.1. Própolis

##### 3.1.1. Histórico

As abelhas existem há mais de 125 milhões de anos e seu sucesso evolutivo permitiu que se tornassem uma espécie perene que pode explorar, potencialmente, todos os hábitat da Terra. Esse sucesso deve-se, em grande parte, à química e à aplicação dos produtos específicos manufaturados pelas abelhas, como mel, cera, veneno, própolis, pólen e geléia real (BANKOVA, 2005b).

O termo “própolis” deriva do grego, onde o prefixo *pro* significa *em frente, na entrada* e a palavra *polis*, que significa *comunidade* ou *cidade*. Esta denominação foi dada, devido à eficiente participação desta substância na defesa da colméia das abelhas (CASTALDO; CAPASSO, 2002). As abelhas usam esta substância para proteger as colméias e a colônia contra a invasão de outros insetos e de microorganismos; no reparo de frestas e buracos presentes na parede da colméia; no preparo de locais assépticos, para que ocorra a postura pela abelha rainha; e na mumificação de cadáveres de invasores (MARCUCCI, 1996).

Assim como todos os produtos apícolas explorados pelo homem, a própolis tem uso registrado há muito tempo (300 a.C.) (GHISALBERTI, 1979). Persas, gregos, romanos e incas já utilizavam a própolis, assim como os egípcios que conheciam algumas de suas propriedades e a aplicavam para embalsamar cadáveres (MARCUCCI, 1996), além de usá-la na medicina da época, por

reconhecerem algumas de suas propriedades terapêuticas (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

Na medicina popular, a própolis era muito utilizada no tratamento de feridas e queimaduras, no tratamento de úlceras estomacais, também como anti-séptico bucal, entre outros usos comuns (BANKOVA, 2005b). Atualmente, este composto é bastante utilizado na indústria farmacêutica e de cosméticos (CASTALDO; CAPASSO, 2002) e na alimentação, principalmente como alimentos funcionais, em certos países orientais, como, por exemplo, o Japão (PARK et al., 1998; MARCUCCI et al., 2001). Recentemente, a própolis ganhou popularidade como alimento saudável, o qual provê saúde ao homem e previne doenças como inflamações, doenças cardíacas, diabetes e até mesmo o câncer (BANKSOTA et al., 2001). Pelo motivo da própolis ser reconhecida como antisséptica, antimicótica, bacteriostática, adstringente, espasmolítica, anti-inflamatória, anestésica e antioxidante, a lista de modos de preparações e usos deste composto é quase infinita (BURDOCK, 1998). Atualmente existem diversos produtos contendo própolis que são comercializados em todo mundo, tais como balas, chocolates, doces, xampus, cremes para a pele, soluções antissépticas, pastas de dente, sabonetes, etc (PARK et al., 1998).

Por todas as propriedades que possui, a própolis tornou-se, nos últimos 30 anos, objeto de intensos estudos farmacológicos e químicos, o que resultou em muitas informações a respeito deste importante produto apícola (PEREIRA et al., 2002; BANKOVA, 2005b). Até os anos 60, pensava-se que a própolis tinha composição química complexa e mais ou menos constante, como a cera e o veneno das abelhas (LINDENFELSER, 1967 apud BANKOVA, 2005b). Pelo grande número de artigos publicados sobre a química da própolis, os pesquisadores começaram a entender que a composição química era altamente variável e dependente da flora do local de coleta das abelhas (BANKOVA et al., 2000).

### **3.1.2. Importância econômica**

O interesse global em pesquisas com própolis é justificado pelo intenso uso deste produto por seres humanos e pelo valor financeiro agregado aos seus produtos, que são comercializados de formas bastante distintas. Os valores de comercialização, por exemplo do extrato etanólico da própolis, é variável. No Brasil, o produto é comercializado em farmácias pelo preço de R\$ 5,00 a R\$ 10,00, mas em Tóquio, no Japão, este valor por atingir extremos como US\$ 150,00 (PEREIRA et al.,

2002). Embora a própolis brasileira seja responsável por 10 a 15% da produção mundial, cerca de 80% da demanda japonesa é proveniente do nosso país. O estado de Minas Gerais produz, aproximadamente, 70% da própolis brasileira, porcentagem equivalente a 28 toneladas da produção total nacional de 40 toneladas/ano (MINAS GERAIS, 2007).

Após a descoberta e divulgação da própolis do tipo verde (própolis de Minas Gerais e São Paulo), esta foi considerada como a de melhor qualidade mundial, fazendo com que este produto alcançasse altos valores comerciais (PEREIRA et al., 2002).

O mercado brasileiro de produtos apícolas, atualmente, está avaliado em US\$ 360 milhões anuais, sendo que a estimativa é de aumentar para US\$ 1 bilhão ao ano. Este setor produz cerca de 15.000 empregos diretos, gerados pelas 200 empresas legalmente registradas no país (O MERCADO, 2009).

### **3.1.3. Origem e composição química**

Nos últimos anos, inúmeras amostras de própolis foram analisadas quimicamente, o que mostrou que a composição de própolis é altamente variável, estando esta variação relacionada com os recursos botânicos disponíveis na região onde as abelhas efetuam suas coletas (BANKOVA, 2005a).

Em geral, a própolis é composta por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos, 5% de grãos de pólen e 5% de outras substâncias que são adicionadas a sua composição. Além destes componentes, existem alguns microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de algumas vitaminas, como B1, B2, B6, C e E (LUSTOSA et al., 2008). As abelhas também adicionam cera, secreções salivares e enzimas durante o processo de produção da própolis (GHISALBERTI, 1979). Além de fatores físico-químicos, a variabilidade genética das abelhas também influencia na composição química da própolis (PARK et al., 1998). Pelas análises químicas, foi possível definir alguns elementos presentes nas resinas de própolis como os exudatos de plantas que são coletados pelas abelhas, substâncias do próprio metabolismo das abelhas e outros materiais que são acrescentados durante o processo de elaboração da própolis (MARCUCCI, 1995).

Quanto ao aspecto, a própolis pode apresentar diferenças quanto à coloração e ao odor, que, segundo Marcucci (1996), são características relacionadas à própria

procedência da própolis. Além dos odores característicos, a própolis pode apresentar coloração variada, tais como marrom escuro, tons esverdeados e marrom avermelhado.

Um tipo de própolis recentemente descoberta no Brasil é a própolis vermelha. Esta própolis é originária da planta de mangue, *Dalbergia ecastophyllum* (SILVA et al., 2008), diferentemente da própolis vermelha proveniente de Cuba, que é produzida a partir de *Clusia nemorosa*, e da própolis vermelha da Venezuela, onde as abelhas coletam partes de *C. scrobiculata* (TRUSHEVA et al., 2006). No entanto, a própolis brasileira que ganhou destaque internacional é a produzida a partir da planta *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), planta popularmente conhecida como alecrim-do-campo ou vassourinha (MARCUCCI; BANKOVA, 1999). Este tipo de própolis é denominado de própolis verde, devido à sua coloração esverdeada característica (PARK et al., 2002; KUMAZAWA et al., 2003). A coloração verde desta própolis é dada pelo material botânico coletado pelas abelhas, especificamente tecidos jovens que contém clorofila, ou seja, brotos e folha jovens (SALATINO et al., 2005).

Como resultado desta grande variedade, a melhor forma de relacionar a origem botânica de determinada amostra de própolis é a análise de sua composição química comparada com a fonte vegetal mais provável. Esta identificação é necessária para se obter algum controle de qualidade e de procedência da própolis, além da possível padronização do tipo de amostra utilizado (PARK et al., 2002).

Atualmente, próximo de 300 componentes, principalmente compostos fenólicos, foram identificados na própolis. A maioria destes compostos isolados pertence a três grandes grupos: flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres, cujas concentrações também variam, dependendo da ecoflora da região de coleta (SIMÕES et al., 2004). Entretanto, ainda podem ser encontrados aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides, esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e outros compostos. Alguns destes componentes estão presentes em, praticamente, todas as amostras de própolis descritas quimicamente, mas outros são exclusivos de própolis de determinadas regiões (LUSTOSA et al., 2008).

Desde os anos 90, estudos revelaram a presença dos flavonóides como os principais componentes das própolis européia. Este mesmo perfil químico era esperado para a própolis verde, pela semelhança farmacológica entre ambas

(SALATINO et al., 2005). Análises da própolis brasileira revelaram, porém, que a própolis da América do Sul apresentam compostos que estão ausentes na própolis européia, tais como diterpenos e compostos prenilatados. Estas análises também mostram que, embora os flavonóides não sejam os componentes principais da própolis verde, eles estão presentes neste material (SIMÕES et al., 2004).

Já foram descritos 12 tipos de própolis brasileiras, caracterizadas a partir de 500 amostras coletadas em todas as regiões do Brasil (exceto região norte). Dentre estes tipos de própolis, a própolis verde foi identificada como a do tipo 12 (PARK et al., 2000). Dausch et al. (2007) sugeriram que a própolis vermelha seja então adicionada à esta relação, como o 13º tipo de própolis encontrada no Brasil.

#### **3.1.4. Propriedades biológicas e farmacológicas**

Apesar de muitos estudos terem sido desenvolvidos para avaliar as características de diversas amostras de própolis, nenhum deles confirmou ou possibilitou o estabelecimento de qualquer relação entre a composição química da própolis e sua efetividade terapêutica (BANKOVA, 2005a). Mesmo assim, o extrato etanólico da própolis é indicado para um grande espectro de distúrbios da saúde tais como: atividade antiviral, contra o vírus da imunodeficiência humana (HARISH et al., 1997), vírus do herpes simplex tipo 1 e tipo 2, adenovírus tipo 2, vírus da estomatite vesicular, poliovírus tipo 2 (AMOROS et al., 1992) e vírus da influenza A (H3N2) (BIAGGI et al., 1990); atividade antibiótica contra muitas bactérias gram-positivas (*Staphylococci* e *Streptococci* sp.) e gram-negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* e *P. aeruginosa*), leveduras e fungos (*Candida albicans*), os quais estão associados com vários graus de patogenicidade no homem (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Segundo Marcucci (1996), esse potencial biológico da própolis deve-se a um possível sinergismo que ocorre entre muitos de seus constituintes.

##### **3.1.4.1. Atividade antimicrobiana**

As ações biológicas da própolis têm sido extensivamente estudadas sobre bactérias e fungos (KUJUMGIEV et al., 1999). Scazzocchio et al. (2005) sugerem que componentes como os flavonóides e como os ácidos caféico, benzóico e cinâmico, podem agir na membrana ou parede celular de um microrganismo, desestabilizando a célula. Devido a esta característica, associa-se à própolis uma maior atividade contra bactérias gram-positivas do que contra as gram-negativas

(REZENDE et al., 2006). Esta propriedade é atribuída, principalmente, à flavona pinocembrina, ao flavonol galangina e ao éster feniletil de ácido caféico (CAPE) que, provavelmente, atuam na inibição do RNA-polimerase bacteriano (UZEL et al., 2005).

Em estudo relacionado ao efeito da própolis sobre leveduras, Oliveira et al. (2006a) demonstraram excelentes atividades fungistáticas e fungicida para este composto.

#### *3.1.4.2. Atividade antiinflamatória*

Alguns autores relacionam a atividade antiinflamatória da própolis à presença de flavonóides, especialmente ao flavonol galangina (LUSTOSA et al., 2008). A galangina inibe a atividade da cicloxigenase (COX) e lipoxigenase, que são enzimas associadas ao metabolismo das prostaglandinas, a partir do ácido araquidônico, envolvido no processo inflamatório (BORELLI et al., 2002).

Os flavonóides possuem atividade antioxidante e aceptora de radicais livres. Assim, são substâncias que podem regular atividades de células relacionadas com a inflamação, como os mastócitos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Além disso, alguns flavonóides são capazes de modular a atividade enzimática do ácido araquidônico, metabolizado por enzimas como a fosfolipase A<sub>2</sub>, a cicloxigenase, a lipoxigenase, interferindo na síntese de óxido nítrico. A inibição destas enzimas pelo ácido araquidônico reduz a produção de prostaglandinas, leucotrienos e óxido nítrico, mediadores cruciais no processo inflamatório (KIM et al., 2004).

#### *3.1.4.3. Atividade antioxidante*

O potencial antioxidante da própolis foi registrado por alguns pesquisadores, conforme descrito por Kumazawa et al. (2004). Esta atividade antioxidante ganhou grande destaque entre as propriedades da própolis, pois o seu efeito antioxidante ou a sua característica aceptora de radicais livres está diretamente relacionado com a prevenção da indução de tumores.

As substâncias presentes na própolis descritas como de ação antioxidante são os flavonóides. A alta quantidade destas substâncias está diretamente relacionada com a eficiência antioxidante de extratos de própolis, como comprovado pelos resultados de Isla et al. (2001), realizados com amostras de própolis argentina.

No entanto, estes mesmos autores ressaltam a possibilidade de outros fatores também estarem envolvidos.

Estudos de antimutagenicidade realizados por Varanda et al. (1999), por meio de ensaios com *Salmonella typhimurium*, mostram uma atividade antimutagênica para extratos etanólicos de própolis. O extrato inibiu o potencial mutagênico da daunomicina, do benzo[a]pireno e da aflatoxina, levando os autores a concluir que a atividade antimutagênica do extrato etanólico da própolis poderia estar relacionada com a presença de flavonóides, em vista da conhecida atividade antioxidante destes compostos.

A relação entre a propriedade antioxidante e a atividade antimutagênica de extrato etanólico da própolis, associado ao conteúdo de flavonóides, indica uma necessidade de maiores investigações sobre a atividade antioxidante dos flavonóides.

### **3.2. Sistema-teste de *Allium cepa***

Muitos sistemas biológicos podem se caracterizar em importantes sistemas-teste para ensaios de atividades mutagênicas de agentes químicos. Muitas espécies de vegetais, como *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana* e *Hordeum vulgare*, têm se mostrado materiais biológicos altamente adequados para este fim. Por meio desses sistemas vegetais podem ser realizados ensaios de aberrações cromossômicas e testes citogenéticos (RANK et al., 2002). Esses organismos-teste têm sido validados em estudos de colaboração internacional entre o “United Nations Environmental Program” (UNEP), a “World Health Organization” (WHO) e a “US Environmental Protection Agency” (USEPA) (GRANT, 1999; MENKE et al., 2001).

Espécies do gênero *Allium* têm sido utilizadas como sistemas-teste em estudos de avaliação dos modos de ação de agentes tóxicos e na avaliação dos efeitos de alguns químicos. Entre as espécies de *Allium*, *A. cepa* (cebola) é a mais indicada como material-teste padrão pela “Royal Swedish Academy of Science” (FISKESJÖ, 1985) e pelo “Gene-Tox Program” (GRANT, 1982).

A espécie *A. cepa* tem sido, freqüentemente, utilizada para se determinar efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico de várias substâncias (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008 e LEME et al., 2008), sendo utilizada como um organismo padrão

para testes rápidos (SMAKA-KINCL et al., 1996), por apresentar boa correlação com sistemas teste de mamífero (GRANT, 1982; RANK; NIELSEN, 1993; CHAUHAN et al., 1999). A espécie *A. cepa*, descrita por Chauhan et al. (1999) como um dos melhores sistemas-teste já estabelecido, é rotineiramente utilizada para avaliar o potencial genotóxico de químicos no ambiente. É considerado um sistema-teste confiável para avaliações de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de diferentes substâncias (MA et al., 1995), devido às características que possui na sua cinética de proliferação, pelo crescimento rápido de suas raízes, pelo grande número de células em divisão, pela sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, pela sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ( $2n = 16$ ) e de grande tamanho (FISKESJÖ 1985). Segundo Rank; Nielsen (1993), esta espécie apresenta uma sensibilidade 82% maior que os resultados obtidos com roedores.

O uso do *A. cepa* como material-teste foi originalmente introduzido por Levan em 1938 (FISKESJÖ, 1985; RANK; NIELSEN, 1993) e, a partir daí, tem sido utilizado para avaliar e classificar a toxicidade de químicos presentes no meio ambiente. Testes com *A. cepa* são adequados por oferecer parâmetros microscópios como aderências cromossômicas, pontes, fragmentação e perdas cromossômicas, C-mitoses e micronúcleos, que podem se caracterizar em evidências ou até indicadores de eventuais mutações no conteúdo genético celular (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008; SOUZA et al., 2009).

Segundo Fiskesjö (1985), resultados positivos obtidos pelo teste de *A. cepa* devem ser considerados como uma indicação de que o químico testado também pode causar danos biológicos a outros organismos. Desta forma, Roberto (2006) sugeriu a utilização do sistema-teste de *A. cepa* como ferramenta para testes de antimutagenicidade, porém, também indica a necessidade de mais estudos para garantir a sua eficácia.

### **3.2.1. Aberrações cromossômicas**

Conforme Fenech (2000), as aberrações cromossômicas podem ser induzidas por meio de diferentes mecanismos, por ações clastogênicas ou aneugênicas de agentes químicos ou físicos. A clastogenicidade é caracterizada por quebras

cromossômicas, enquanto a aneugenicidade é oriunda de alterações nas estruturas citoplasmáticas celulares (FENECH, 2000), por exemplo, no fuso mitótico (FERNANDES et al., 2007).

Por meio da análise de células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, por exemplo, pode-se identificar uma série de aspectos citogenéticos que representariam eventuais mutações no conteúdo genético de uma célula (VIDAKOVIĆ-CIFREK et al., 2002). Neste contexto, Obe et al. (2002) sugerem que as aberrações cromossômicas poderiam ser consideradas como mudanças visíveis, microscopicamente, na molécula de DNA.

### 3.3. Cultura de células de mamíferos (HTC)

Culturas de células de mamíferos são utilizadas, com sucesso, nos estudos de avaliação da mutagenicidade (COSTA et al., 2008) e antimutagenicidade (BELLINI et al., 2006) de extratos orgânicos. Estes testes apresentam vantagens pela facilidade na padronização das condições do ensaio e pela organização do material genético assemelhar-se às células *in vivo* (RABELO-GAY et al., 1991). Dentre estas vantagens, Freshney (2005) aponta dois principais benefícios: o controle físico-químico do ambiente experimental (pH, temperatura, pressão osmótica e tensão de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) e o controle das condições fisiológicas, as quais devem ser mantidas praticamente constantes.

Atualmente, são utilizados diversos tipos celulares para executar diferentes experimentos. Células de humanos, como células HeLa, HepG-2, HL-60, etc. e de outros animais como por exemplo as células, CPAE (bovina), MDCK (canina), LLC-PKI (suína), Vero (macaco), são vastamente utilizadas em testes *in vitro* (FRESHNEY, 2005).

Dentre as células de roedores comumente utilizadas em cultura (HTC, CHO-K1, V79, GH3, etc.), as células HTC (*Hepatoma Tissue Culture*) são amplamente utilizadas em análises de indução de danos no DNA (COSTA et al., 2008). A vantagem em utilizar este tipo celular está em sua característica metabolizadora, sua alta sensibilidade e curto ciclo de divisão celular, como demonstrado por (BELLINI et al., 2006). Estes mesmos autores comprovaram uma maior sensibilidade das células HTC, quando submeteram estas células e células CHO ao mesmo ensaio, para testar a mutagenicidade de extrato do cogumelo-do-sol (*Agaricus blazei*). As células

HTC são oriundas de fígado de rato (*Rattus norvegicus*) e, por esta razão, possuem sistema endógeno de metabolização (OLIVEIRA et al., 2006b).

### **3.3.1. Teste do micronúcleo (MN)**

Muitos agentes tóxicos apresentam uma capacidade de reagir com o material genético das células. Quando uma célula é exposta, por exemplo, a uma substância química tóxica, é possível encontrar pequenas massas intracitoplasmáticas de cromatina, com aspecto de um núcleo pequeno, presentes no citoplasma das células. Estas estruturas são denominadas de micronúcleos. Os micronúcleos são resultantes de quebras cromossômicas ou de cromossomos perdidos durante a divisão celular (FENECH, 2000). A ocorrência de micronúcleos pode ser espontânea, porém a sua presença nas células pode caracterizar um evento de indução de dano ao DNA (HEDDLE et al., 1983).

O teste do micronúcleo tem se mostrado uma técnica eficaz, tanto em testes *in vivo* como *in vitro*, para avaliar a potencialidade mutagênica de substâncias químicas (HEDDLE et al., 1983). Este teste é considerado uma técnica de simples análise e aplicabilidade, não sendo necessário o conhecimento prévio do cariótipo do organismo testado, bastando, apenas, que as células estejam em proliferação (HAYASHI et al., 1998).

O teste do MN pode ser realizado com diversos organismos, como, por exemplo, *A. cepa* (FERNANDES et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008), *Mus musculus* (PEREIRA et al., 2008) e *Oreochromis niloticus* (SOUZA; FONTANETTI, 2006; VENTURA et al., 2008). Em *A. cepa*, o micronúcleo pode ser observado tanto em células meristemáticas como em células da geração F<sub>1</sub> (região não-meristemática). Neste organismo teste, também podem ser realizados testes de aberrações cromossômicas, cujos ensaios são aplicáveis em células da região meristemática da raiz (LEME; MARIN-MORALES, 2008b).

O teste do MN tem sido bastante utilizado em testes *in vitro* (FENECH, 2000), podendo ser aplicado em diferentes tipos celulares, como CHO (células de ovário de hamster chinês, *Cricetulus griseus*) (OLIVEIRA et al., 2007), HTC (COSTA et al., 2008), V79 (fibroblastos pulmonares de hamster chinês) (MENOLI et al., 2001), HEp-2 (células de carcinoma de laringe humana) (MIYAJI et al., 2006), HeLa (células cancerosas humanas) (JAGETIA; ARUNA, 2003).

Em testes *in vitro*, o ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese baseia-se, no uso da citocalasina B com a finalidade de impedir a divisão celular, depois de ocorrida a divisão nuclear, resultando em uma célula binucleada. Este evento torna esta célula diferenciada, sendo possível discriminar as células que sofreram divisão, avaliando se estas são ou não portadoras de MN (FENECH, 2000). Este micronúcleo evidencia a presença de alterações cromossômicas durante o ciclo celular (FENECH et al., 1999).

Para que uma estrutura citoplasmática possa ser considerada como micronúcleo, alguns critérios de análise foram estabelecidos por (FENECH, 2000), tais como: o diâmetro do MN deve estar entre 1/16 a 1/3 do diâmetro do núcleo principal; o MN não deve ser refringente; não deve haver ligação entre o MN e o núcleo principal; o MN deve possuir intensidade de coloração semelhante, ou mais intensa à do núcleo principal.

Ma et al. (1995) sugerem que, de forma semelhante ao teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese, a presença de micronúcleos em células da geração F<sub>1</sub> de raízes de *A. cepa*, pode indicar possíveis danos no DNA, ocorridos na célula mãe, durante o processo mitótico.

### **3.3.2. Ensaio do cometa**

O ensaio do cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) tem sido indicado como um método para se detectar mudanças muito pequenas na estrutura do DNA, célula a célula, tais como as atividades de reparo, o modo de seu empacotamento e sua integridade (KOPPEN et al., 1999).

O ensaio do cometa tem sido utilizado por diversos pesquisadores para avaliar, *in vitro*, a genotoxicidade de vários químicos, em testes com vários tipos celulares, normais ou transformados, incluindo células humanas, animais ou vegetais (DAUER et al., 2003). Tice et al. (1990) indicam o uso do ensaio do cometa para verificar danos induzidos no DNA por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes.

Este teste consiste, particularmente, em uma técnica valiosa e barata, pois permite a detecção de diferentes respostas celulares ao dano e ao reparo de DNA, observadas pela migração em eletroforese, de qualquer tipo celular obtido por uma suspensão simples (SASAKI et al., 1997; MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998).

Segundo Hartmann; Speit (1997), o ensaio do cometa possibilita a detecção de quebras de fitas simples de DNA e/ou sítios álcali-lábeis em células individualizadas.

No trabalho de Christofolletti et al. (2009), foram avaliados diferentes protocolos para o ensaio do cometa utilizando-se eritrócitos de *Oreochromis niloticus* (Pisces). Estes autores indicam que tanto o pH = 12.1 quanto o pH > 13 são eficientes para avaliar atividade genotóxica. De acordo com Tice et al. (2000), o ensaio do cometa realizado com o pH > 13 é bastante utilizado para maximizar a expressão de sítios álcali-lábeis e quebras de fitas simples de DNA e, portanto, é o mais recomendado para ser usado em testes de genotoxicidade realizados, principalmente, com células de vertebrados.

Estudos realizados por Matsumoto et al. (2005) e por Ventura et al. (2008) mostram uma sensibilidade do ensaio do cometa na detecção de danos em células simples, sendo compatível com os resultados obtidos por outros métodos de avaliação, o que confirma a eficiência deste teste em avaliações de genotoxicidade e antigenotoxicidade de vários agentes. Bianchi (2008) observou em experimentos com culturas de células HTC, que o ensaio do cometa se mostrou mais sensível que o teste do micronúcleo, quando avaliou os efeitos do inseticida malation sobre estas células em cultura.

## 4. RESULTADOS

---

### **ARTIGO 1 – Ação antioxidante dos flavonóides – Uma revisão.**

Matheus Mantuanelli Roberto & Maria Aparecida Marin-Morales.

### **ARTIGO 2 – Avaliação do potencial antimutagênico de extratos etanólicos da própolis verde e de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), por meio de sistema-teste de *Allium cepa*.**

Matheus Mantuanelli Roberto, Cláudia Masrouah Jamal, Osmar Malaspina, Maria Aparecida Marin-Morales.

### **ARTIGO 3 – Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extrato de própolis verde e de sua fonte botânica, por meio de testes com células HTC mantidas em cultura.**

Matheus Mantuanelli Roberto, Cláudia Masrouah Jamal, Sílvia Tamie Matsumoto, Osmar Malaspina, Maria Aparecida Marin-Morales.

## **Ação antioxidante dos flavonóides – Uma revisão.**

Matheus Mantuanelli Roberto<sup>1</sup> & Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, CP 199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

## Resumo

Apesar do avanço tecnológico e o desenvolvimento de novas drogas, a busca por substâncias naturais com propriedades terapêuticas aumentou consideravelmente nas últimas décadas. Os flavonóides, encontrados nos vegetais como metabólitos secundários e presentes na dieta humana, são compostos polifenólicos que apresentam reconhecidas atividades biológicas. Os seres humanos consomem pequenas quantidades de flavonóides, por meio de frutas e vegetais, e por meio de alguns produtos naturais, como por exemplo, a própolis e seus derivados. São conhecidos, aproximadamente, 4.000 tipos de flavonóides, divididos entre 14 classes. Dentre estas, apenas seis classes fazem parte da dieta humana: antocianidinas, isoflavonóides, flavonóis, flavonas, flavanóis e flavononas. Existem registros indicando que os flavonóides possuem propriedades antibióticas, antiinflamatórias, antioxidantes, dentre outras. A atividade antioxidante dos flavonóides acontece de acordo com sua capacidade de doar átomos de hidrogênio, de seus grupos hidroxilas, para um radical livre e formar radicais estabilizados. Alguns autores tentam relacionar a capacidade aceptora de radicais livres dos flavonóides, de diferentes classes, com sua estrutura química, para obter informações sobre qual tipo de flavonóide é mais eficaz como antioxidante. No entanto, existem informações controversas e duvidosas quanto à relação estrutura/atividade de determinados flavonóides, fazendo-se necessários mais estudos, para que os flavonóides possam ser incorporados, adequadamente, à dieta ou utilizados como agentes terapêuticos de forma segura.

**Palavras-chave:** flavonóides, antioxidantes, radicais livres, relação estrutura/atividade.

## 1. Introdução

Atualmente, existem grandes evidências de que as mutações em células somáticas não estejam apenas envolvidas no processo de carcinogênese, mas também que elas participem da gênese de outras doenças crônicas degenerativas, como a arteriosclerose e doenças cardíacas, uma das principais causas de morte na população humana (FLORA et al., 1996). Fatores de risco como o estilo de vida, dieta, agentes infecciosos e predisposição genética podem aumentar a incidência de doenças degenerativas e câncer. No entanto, nem sempre é possível prevenir doenças relacionadas às mutações, apenas reduzindo a exposição a agentes mutagênicos e carcinogênicos, mas também buscando por compostos que atuem na proteção do DNA (RIBEIRO et al., 2006). Sabe-se que milhões de novos casos, por exemplo de câncer, poderiam ser prevenidos por ano, caso houvesse a interferência da ação de compostos incorporados à dieta alimentar (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006).

Os flavonóides são componentes importantes e presentes na dieta humana (LUGASI et al., 2003). Eles compõem um grupo de compostos polifenólicos, naturalmente encontrados, de forma ubíqua, no reino vegetal e possuem atividades biológicas importantes (PETERSON; DWYER, 1998). Compostos polifenólicos são metabólitos vegetais secundários que exercem diversas atividades sobre os seres vivos (DI CARLO et al., 1999).

De acordo com Aggarwall; Shishodia, (2006), os flavonóides são um dos componentes fitoquímicos freqüentemente presentes na dieta humana e parecem ser compostos capazes de promover certa proteção contra o desenvolvimento do câncer. O consumo humano diário pode variar de 50 a 800 mg/dia, dependendo do consumo de vegetais e frutas (LUGASI et al., 2003) mas, em média, a dieta ocidental diária contém, aproximadamente, 1 g de uma mistura de flavonóides, quantidade esta que provê uma concentração farmacologicamente significativa para fluídos corpóreos e tecidos (ASGARY et al., 1999). No entanto, de acordo com Kang (2007), o consumo de flavonóides pode variar entre diferentes países, uma vez que a sua ingestão está estritamente relacionada à cultura local. Acredita-se que estes agentes, possam suprimir o processo inflamatório que leva à transformação, hiperproliferação e a iniciação da carcinogênese. Sua influência inibitória poderia

suprimir os passos finais da carcinogênese, como a angiogênese e a metástase (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006).

Mais de 4.000 tipos de flavonóides foram identificados nas plantas vasculares e eles variam em tipo e quantidade, devido a variações no crescimento, condições e maturação das plantas (PIERPOINT, 1986). Apenas um pequeno número de espécies vegetais tem sido examinado, sistematicamente, quanto ao seu conteúdo em flavonóides (HARBORNE, 1988) e, portanto, a identificação e a quantificação de todos os tipos de flavonóides consumidos pelos humanos estão incompletas (PIERPOINT, 1986).

Os flavonóides formam um dos maiores grupos de compostos secundários, baseados em uma estrutura comum, produzidos pelas plantas, e são utilizados como substâncias protetoras contra ação de fungos parasitas (HARBORNE, 1988), herbívoros, patógenos e danos oxidativos às células (SWAIN, 1986). Por outro lado, os flavonóides também funcionam como estímulos para polinizadores, sendo então importantes para o evento de polinização (HARBORNE, 1986), guiando os insetos e pássaros para a fonte do recurso energético oferecido pelo vegetal (HARBORNE, 1988). As antocianinas, como exemplo de estímulo, produzem coloração rosa, vermelha, lilás, violeta e azul em flores, frutas e vegetais, atraindo os polinizadores (COULTATE, 1990).

Pelo potencial protetor dos flavonóides, muitos insetos coletam estes compostos das plantas para também utilizá-los como agentes protetores de ninhos, como por exemplo, as abelhas. Neste caso, as abelhas coletam estes protetores secundários das plantas e utilizam na construção da colméia, o que confere uma proteção do ninho contra agentes patogênicos como bactérias e fungos (MARCUCCI, 1996). Assim, o consumo de própolis pode corresponder a uma fonte adicional de flavonóides, ao consumo obtido pela dieta de origem vegetal.

Muitos flavonóides, como o canferol, a apigenina, a crisina, a galangina, entre outros, são encontrados na própolis produzida pelas abelhas e são um dos principais responsáveis por suas atividades biológicas (SIMÕES et al., 2004). A própolis tem sido usada na medicina popular com propósitos antiinflamatórios, especialmente na Europa (GRUNBERBER et al., 1988). Ainda é um dos medicamentos mais freqüentemente usados nos países balcânicos, para o tratamento de ferimentos e queimaduras, usado também como antiséptico bucal e no tratamento de úlceras estomacais (MARCUCCI, 1996). Alguns flavonóides

(canferol e apigenina, por exemplo) também foram identificados no exudato das folhas de *Baccharis dracunculifolia*, o alecrim-do-campo, em concentrações similares às da própolis. Desta forma, a identificação dos flavonóides e a comparação do perfil químico de uma amostra de própolis com o perfil de algumas plantas podem servir como uma ferramenta eficaz para determinar a fonte botânica utilizada pelas abelhas para coletar material (PARK et al., 2004).

Os flavonóides podem ser monoméricos ou poliméricos. Os monoméricos variam bastante em tamanho, como, por exemplo, a flavona, que tem massa molar de 222 g/mol, e a antocianina azul, cuja massa molar é de 1.759 g/mol (HARBORNE, 1988). Os compostos poliméricos, chamados de taninos, são divididos em dois grupos, de acordo com a sua estrutura química: os de estrutura química condensada e os hidrolisáveis (BRUNE et al., 1989). Taninos condensados são polímeros de flavonóides (MIDDLETON; KANDASWAMI, 1993) e taninos hidrolisáveis são os que contêm ácido gálico ou compostos similares, esterificados a carboidratos (BRUNE et al., 1989).

Os flavonóides representam a subclasse polifenólica com a estrutura principal C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Figura 1). Eles podem ser divididos em várias classes, de acordo com o grau de oxidação do oxigênio heterocíclico (TAPIERO et al., 2002a).

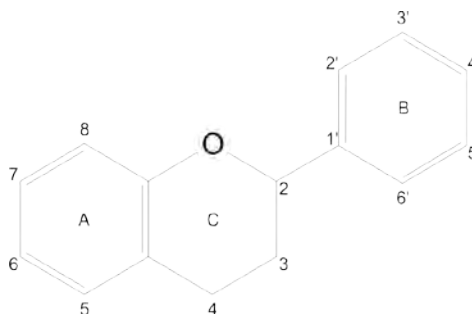


**Figura 1:** Estrutura básica dos flavonóides no padrão C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. A e B = anéis fenólicos; C = pirano.

A quercetina, rutina e robinina são os flavonóides glicosilados mais comuns em nossa dieta. Eles são hidrolisados pela flora intestinal, produzindo agliconas biologicamente ativas, que são, basicamente, flavonóides sem açúcar (KÜHNAU, 1976). A quercetina é o flavonóide mais abundante em nossa dieta, pelo fato de ser encontrado, predominantemente, em muitos alimentos, é também um dos flavonóides mais estudados, quanto aos seus efeitos biológicos (HERTOG et al., 1993a).

Os flavonóides, exceto as chalconas, apresentam uma estrutura química tricíclica chamada fenilbenzopirano ou estrutura flavona. A estrutura dos flavonóides varia, amplamente, dentro das principais classes e incluem substituições como hidrogenação, hidroxilação, metilação, malonilação, sulfação e glicosilação (HARBORNE, 1986; 1988).

Os flavonóides podem ser divididos em 14 classes, sendo que apenas seis delas fazem parte da dieta humana (Figura 2) (MARTÍNEZ-FLORES et al., 2002; YILMAZ; TOLEDO, 2004).

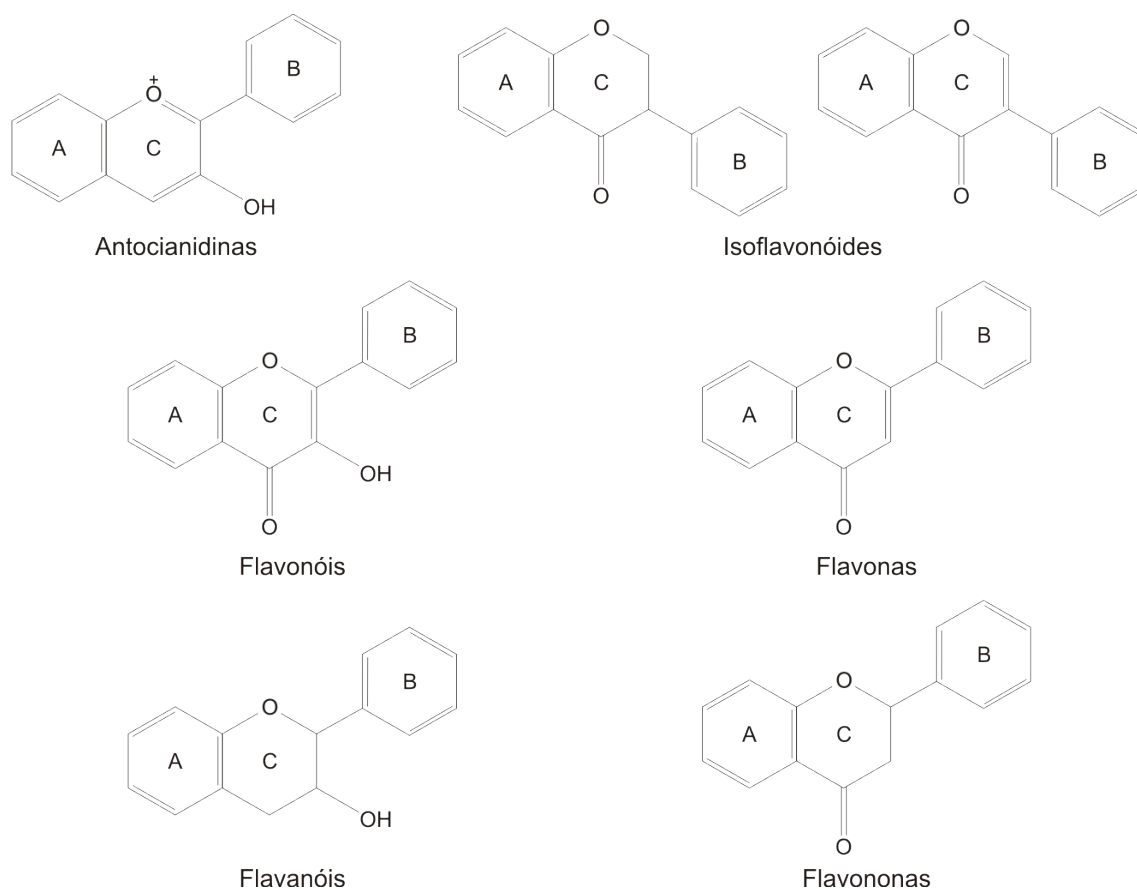


**Figura 2:** Estrutura das diferentes classes de flavonóides presentes na dieta humana.

Flavonóis são estruturas químicas que possuem um grupo carbonila na posição 4, um grupo hidroxila na posição 3 e uma dupla ligação entre as posições 2 e 3. Os flavonóis são, principalmente, representados pela miricetina, fisetina, canferol e quercetina, sendo este último, como já citado, o principal flavonóide de nossa dieta, estando presente em frutas, vegetais, bebidas (sucos, vinhos, chás), sendo, particularmente, abundante em cebolas (0,3 mg/g no peso *in natura*) (HERTOG et al., 1992) e em diversos tipos de chás (10-25 mg/L), como o chá verde, feito com *Camellia sinensis* (HERTOG et al., 1993b).

Flavonas são estruturas que possuem um grupo carbonila na posição 4 e uma ligação dupla entre as posições 2 e 3. As flavonas, principalmente representadas pela luteolina, wogonina e apigenina, são menos comuns, mas presentes em certos alimentos como a pimenta vermelha doce (luteolina) e o aipo (apigenina) (HERTOG et al., 1992);

Flavononas são estruturas que possuem um grupo carbonila na posição 4. Flavononas são, principalmente, representadas pela taxifolina, naringenina e hesperidina. A principal fonte de flavononas são os sucos cítricos, sendo a hesperidina a mais consumida, pois está presente na laranja (125-250 mg/L de suco) (ROUSSEFF et al., 1987);

Flavanóis são estruturas químicas que possuem um grupo hidroxila na posição 3. Também são chamados de proantocianidinas, flavan-3-ol ou catequinas. São representadas pelas catequinas, epicatequinas, galato epicatequina e epigallocatequina-3-galato, presentes em uvas negras, vinho tinto e no chá verde (YILMAZ; TOLEDO, 2004). As catequinas são, pela abundância, os principais flavonóides das infusões. Folhas jovens contêm aproximadamente 200-340 mg de catequinas, galocatequinas e seus derivados galatos, por grama de folhas secas (HARA et al., 1995). Uma infusão de chá verde contém 1 g/L de catequina. No chá-preto (*C. sinensis*), seu conteúdo é reduzido para metade do seu valor, devido à sua oxidação para polifenóis mais complexos, durante a fermentação (DING et al., 1992 apud TAPIERO et al., 2002b).

Antocianidinas são compostos que possuem um grupo hidroxila na posição 3 e duas duplas ligações, sendo uma entre um átomo de oxigênio e o carbono 2 e outra entre os carbonos 3 e 4. São flavonóides coloridos, responsáveis pela coloração vermelha, azul e violeta das frutas e vegetais, como as beterrabas, uvas, cerejas, berinjelas e vinhos. São exemplos deste tipo de flavonóide a delphinidina, a cianidina, a petunidina, a peonidina e a malvidina (YILMAZ; TOLEDO, 2004);

Isoflavonóides são estruturas químicas com um grupo carbonila na posição 4 e o anel B ligado ao restante da molécula no carbono 3. Ainda podem ter uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3. Também chamados de isoflavonas, são representadas, principalmente, pela daidzeína, genisteína e coumestrol. A principal fonte é a soja, que contém, aproximadamente, 1 mg de genisteína e daidzeína por grama do grão seco (REINLI; BLOCK, 1996). Essas isoflavonas têm recebido considerável atenção devido à suas propriedades estrogênicas e sua sugerida

participação na prevenção do câncer de mama e osteoporose (TAPIERO et al., 2002b). Como exercem efeito sobre o metabolismo de hormônios, são considerados fitoestrógenos (KURZER, 2000).

Dentre os flavonóides, as flavonas e os flavonóis são os de maior ocorrência e diversidade estrutural (HARBORNE et al., 1999).

Substituições nos anéis A e B dão origem a diferentes compostos para cada classe de flavonóides (PIETTA, 2000), e originam-se por metilação dos grupos hidroxilas, prenilação<sup>1</sup> e glicosilação. Outras modificações podem formar biflavonóides, lignanas, próantocianidinas oligoméricas, ésteres glicosídicos com outros fenólicos, etc (MATKOWSKI, 2008).

Além disso, existem outros flavonóides simples e ácidos fenólicos, outras classes de polifenóis como as proantocianinas, compostas de monômeros flavan-3-ol e seus respectivos oligômeros. Outros, como os estilbenos, não estão presentes em alimentos vegetais. No entanto, um deles, o resveratrol, tem recebido grande atenção, pela sua presença em vinhos e por suas propriedades anticarcinogênicas (JANG et al., 1997; SAVOURET; QUESNE, 2002).

O modo de ação de compostos polifenólicos está relacionado com a sua estrutura química e solubilidade, que conferem atividade biológica e influenciam na eficiência de sua absorção (TAPIERO et al., 2002b).

Um antioxidante é definido como um composto que inibe ou atrasa a oxidação de substratos, mesmo se o composto está presente em concentrações, significativamente, mais baixas que o substrato oxidável (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995).

Um bom antioxidante deve:

- Extinguir, especificamente, radicais livres;
- Quelar metais redutores;
- Interagir com (regenerar) outros antioxidantes dentro da rede antioxidante;
- Ter um efeito positivo na expressão gênica;
- Ser rapidamente absorvido;

---

<sup>1</sup> Mecanismo comum no qual as proteínas são ancoradas à superfície da membrana celular em mamíferos. Em algumas destas proteínas, o lipídeo anexo pode ser um grupo farnesil (15 carbonos) ou um grupo geranilgeranil (20 carbonos). Diferentes enzimas anexam os dois tipos de lipídeos. É possível que as reações da prenilação visem proteínas de diferentes membranas, dependendo de qual lipídeo é anexado (NELSON; COX, 2004).

- Ter uma concentração em tecidos e fluídos biológicos em nível fisiologicamente relevante;
- Funcionar em domínios aquosos e/ou de membranas (VALKO et al., 2006).

Muitos compostos antioxidantes, ocorrem naturalmente em plantas, e tem sido identificados como seqüestradores de radicais livres ou oxigênios ativos (ZHENG; WANG, 2001). Recentemente, aumentou, consideravelmente, o interesse em se encontrar antioxidantes naturais, que possam ser usados em produtos alimentícios ou medicinais, em substituição a antioxidantes sintéticos, que tem seu uso restrito, devido aos seus efeitos colaterais, como carcinogenicidade (ITO et al., 1983).

Antioxidantes naturais têm a capacidade de fornecer qualidade e estabilidade aos alimentos, além de poderem atuar como nutracêuticos, que impedem as reações em cadeia dos radicais livre em sistemas biológicos. Estes compostos podem ainda conferir benefícios adicionais à saúde dos seus consumidores. Sugere-se que esses compostos possam afetar uma grande variedade de funções biológicas celulares, pela força de sua propriedade aceptora de radicais (LAI et al., 2001).

A atividade antioxidante dos flavonóides acontece de acordo com sua capacidade de doar átomos de hidrogênio, pertencente a um grupo hidroxila, para um radical livre e formar radicais fenólicos estabilizados. Além disso, a anfifilicidade<sup>2</sup> dos flavonóides está relacionada com a sua habilidade de seqüestrar radicais catalisadores da membrana, prevenindo a progressão da reação em cadeia causada pelo radical. Desta forma, a capacidade dos flavonóides seqüestrar radicais está relacionada com a proteção ou com o aumento de antioxidantes endógenos, assim como sua habilidade em quelar íons de metais de transição (ROSS; KASUM, 2002).

O termo ROS (Espécies Reativas de Oxigênio) caracteriza os radicais como o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e a hidroxila ( $\cdot OH$ ), assim como espécie não-radical derivada de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). De forma similar às ROS, existem as RNS (Espécies Reativas de Nitrogênio) que podem ser caracterizadas pelo óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) (BOOTS et al., 2008). Nem todas as ROS e RNS são igualmente reativas, pois

---

<sup>2</sup> Anfifilicidade é a característica de uma substância que atua como lipofílica e hidrofílica.

alguns compostos como  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{NO}^{\cdot}$ , reagem, seletivamente, *in vivo* com poucas moléculas biológicas, comparando-se com o radical  $^{\cdot}\text{OH}$ , por exemplo, que é uma ROS altamente reativa, que irá reagir com, praticamente, qualquer molécula que encontrar (GALLI et al., 2005).

Outra diferença entre várias ROS compreende o sítio de sua reatividade. Radicais livres reagem quase que, instantaneamente no sítio de formação, enquanto que ROS não-radicais, como o peróxido de hidrogênio, atravessam membranas biológicas e, desta forma, ampliam sua reatividade e possível toxicidade (BOOTS et al., 2008).

A associação do antioxidante com o oxigênio reativo é um mecanismo freqüentemente observado nas reações celulares. Outros mecanismos incluem a prevenção da formação de ROS pela ligação com metais ou pela inibição enzimática. Antioxidantes quebram correntes que previnem o dano pela interferência com a propagação em cascata dos radicais livres (MATKOWSKI, 2008). Diversos efeitos conhecidos, causados pela formação aumentada de ROS em sistemas biológicos, incluem a peroxidação de membranas lipídicas, dano oxidativo a ácidos nucléicos (DNA e RNA) e carboidratos e a oxidação de proteínas (SIES, 1991). Horváthová et al. (2005), em seu estudo com células de melanoma humano (HMB-2), mostraram que os flavonóides quercetina e luteolina foram eficazes em protegerem o DNA de células, contra os efeitos oxidativos do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), possivelmente, por serem excelentes aceptores de ROS.

O seqüestro de ROS nas células é promovido por sistemas enzimáticos e não enzimáticos, que constituem a defesa antioxidante. Os sistemas enzimáticos possuem várias enzimas, dentre elas a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutational peroxidase (SIES; CADENAS, 1985), que são as principais enzimas que agem, especificamente, contra ROS (DORNAS et al., 2007).

Um composto antioxidante pode ser reciclado dentro de uma célula ou ser, irreversivelmente, danificado, podendo os produtos derivados da oxidação serem substâncias menos danosas ou mesmo inofensivas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007 apud MATKOWSKI, 2008).

Formas oxidadas de um antioxidante, geralmente, compreendem um radical que, devido a alguma atividade residual do composto original, ainda pode causar danos a alvos vitais da célula (BAST; HAENEN, 2002). Por este motivo é importante que a forma oxidada, originada durante o processo de proteção contra os radicais

livres, seja convertida, novamente, à sua forma reduzida (BAST; HAENEN, 2002). A vitamina C, por exemplo, é uma molécula endógena que participa da regeneração de antioxidantes oxidados (BIEWENGA et al., 1997). Dentre os antioxidantes, os enzimáticos são mais eficientemente reciclados (BOOTS et al., 2008).

O corpo humano contém uma distinta rede de antioxidantes, que podem reduzir quimicamente uns aos outros, diminuindo, assim, a reatividade de um radical antioxidante formado, e recuperando o antioxidante reduzido, para a defesa contra espécies reativas. Desta forma, os antioxidantes agem em sinergismo para destruir as espécies reativas e, assim, antioxidantes enzimáticos são capazes de realizar uma proteção mútua (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999).

A atividade antioxidante de um composto pode depender da espécie de radical livre gerada e/ou dos oxidantes existentes num dado sistema (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995; GALVEZ et al., 1995; CAO et al., 1997). Esta atividade tem sido descrita como resultado da combinação da atividade de quelação do ferro com a varredura de radicais livres (AFANAS'EV et al., 1989).

Os flavonóides têm mostrado ser potentes antioxidantes, porque eles têm alta atividade aceptora (BORS et al., 1990; CAO et al., 1997) e uma capacidade de complexar o ferro (KORKINA; AFANAS'EV, 1997). Estas substâncias exercem efeitos biológicos como antioxidantes, seqüestradores de radicais livres (HANASAKI et al., 1994), e queladores de cátions bivalentes (AFANAS'EV et al., 1989).

As atividades bioquímicas dos flavonóides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química e da orientação relativa de várias partes na molécula (CODY, 1988).

Segundo Rice-Evans et al. (1996), o papel importante na atividade dos flavonóides é a dupla ligação existente entre C2-C3, a presença de um grupo hidroxila em C3 e o número de grupos hidroxila no anel B, os quais atuam como doadores de elétrons e são responsáveis pela atividade aceptora de radicais dos flavonóides. No entanto, algumas informações são controversas, pois no trabalho de Areias et al. (2001), o eridictiol, caracterizado por não ter dupla ligação entre C2-C3 ou o grupo hidroxila em C3 (Figura 1) e por mostrar a habilidade de diminuir o estabelecimento de ligações com hidrogênio, mostrou-se o mais eficiente antioxidante, seguido pela quercetina, luteolina e taxifolina. Além disto, de acordo com Lien et al. (1999), a presença de grupos hidroxilas em C3' e C4' e a adição de um grupo hidroxila em C4 parecem aumentar o potencial antioxidante. De acordo

com Valko et al. (2006), uma característica estrutural importante para as propriedades antioxidantes de um flavonóide também envolve a presença de uma insaturação entre C2-C3, mas conjugada com o grupo oxo presente na posição 4 do anel C.

Os flavonóides podem interferir não apenas na propagação das reações dos radicais livres, mas também na formação dos radicais, por quelar metais de transição ou inibir as enzimas envolvidas no início da reação (SICHEL et al., 1991). A inibição de algumas enzimas pelos flavonóides podem acontecer pela reação do flavonóide com os radicais livres gerados no sítio ativo dessas enzimas (TAKAHAMA, 1985).

Alguns autores descreveram a capacidade dos flavonóides formarem complexos com íons de metais de transição, fazendo com que comportem-se como antioxidantes ou pró-oxidantes, dependendo das condições de reação (CAO et al., 1997; SUGIHARA et al., 1999). Em contraste com os efeitos benéficos, alguns flavonóides demonstraram efeitos mutagênicos em experimentos realizados *in vitro* (SAHU; GRAY, 1994). Esses efeitos danosos observados para os flavonóides podem ser resultado de uma ação pró-oxidante e não antioxidante (HANASAKI et al., 1994; SAHU; GRAY, 1994). Alguns compostos que possuem atividade antioxidante conhecida, como o  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E), podem demonstrar efeito pró-oxidante, quando estão em altas concentrações (HUANG et al., 1995). Por outro lado, estudos mais recentes, como o realizado por Yanishlieva et al. (2002), demonstraram que o  $\alpha$ -tocoferol não possui efeito pró-oxidante, mas perde sua eficácia em grandes concentrações, devido à sua participação em reações além das antioxidativas. De acordo com Biewenga et al. (1997), a atividade pró-oxidante é definida como a atividade de um antioxidante que encontra-se em condições onde ele produz um estresse oxidativo maior do que quando ele está ausente. Tais condições foram descritas por Valko et al. (2006): alta concentração de antioxidantes fenólicos; presença de metais redox ativos (por exemplo, cobre e ferro) e pH alto.

Os efeitos biológicos e farmacológicos de um composto flavonóide é dependente do seu comportamento, isto é, se tem efeito antioxidante ou pró-oxidante. É extremamente importante entender o comportamento antioxidante e/ou pró-oxidante de um flavonóide e a relação da estrutura química com sua atividade, considerando o fato que eles exercem várias funções fisiológicas e farmacológicas importantes, como por exemplo, algumas ações tóxicas (CAO et al., 1997).

Uma vez que a atividade antioxidante dos flavonóides varia, consideravelmente, de acordo com sua estrutura química e com a variação de grupos funcionais presentes, alguns autores estabeleceram relações entre a estrutura e a atividade (SARs) para os flavonóides (DUGAS et al., 2000; FIRUZI et al., 2004).

De acordo com Haenen et al. (2006), a avaliação por dados de experimentos *in vitro* pode revelar a atividade de muitos compostos. A real utilidade desta avaliação seria estabelecer a dependência da eficácia observada com a estrutura química. Deste modo, não apenas o agente mais potente seria encontrado, dentro de uma série deles, mas também a eficácia na predição de antioxidantes não testados. Desta forma, pistas para a identificação ou *design* de antioxidantes, ainda mais potentes, seriam obtidas, além da relação estrutura/atividade, que ajudaria a elucidar o mecanismo de ação molecular de um grupo de compostos.

A relação estrutura-atividade de fenóis substituídos formou a base da mais complexa relação com a estrutura construída em polifenóis, por exemplo, os flavonóides. Uma análise mais profunda dos dados obtidos em experimentos *in vitro*, sobre o seqüestro de peroxinitrito por flavonóides, relevaram que dois grupos diferentes dentro dos flavonóis têm a capacidade de eliminar o peroxinitrito (HEIJNEN et al., 2001 e 2002): o grupo com alterações no anel B e o grupo com alterações no anel AC.

Um flavonól é um potente acceptor de peroxinitrito, quando o anel B é um grupo catecol (duas hidroxilas nas posições 3'e 4', apenas a substituição de um dos grupos OH é permitida) ou quando o anel AC tem três hidroxilas nas posições 3, 5 e 7 (a substituição do grupo é permitida em 5 e 7, mas não em 3). Esta relação estrutura/atividade dos flavonóides é consistente com a dos fenóis substituídos. Isto indica que o mecanismo molecular para seqüestrar o peroxinitrito pelos flavonóis e fenóis é semelhante (HAENEN et al., 2006).

A relação estrutura-atividade dos flavonóides são, principalmente, descritas na natureza química da molécula e, algumas vezes, está ligado a parâmetros simples como o número de grupos hidroxilas (HAENEN et al., 2006). Como pode ser visto na relação estrutura-atividade de fenóis substituídos, a situação real é muito mais complexa. Não apenas o número, mas também a posição dos grupos na molécula afeta o efeitos da doação de elétrons e a potência raptora das moléculas (HEIJNEN et al., 2001). De acordo com Valko et al. (2006), o tamanho, a natureza, a

posição dos substitutos e o número de grupos hidroxilas são fatores que influenciam se o flavonóide irá atuar como um antioxidante ou um modulador de atividade enzimática, ou se possuirá propriedade antimutagênicas ou citotóxicas.

Pode-se explicar, desta forma, a grande diferença existente entre a atividade da apigenina (5,7,3'-trihidroxi flavona) e a galangina (3,5,7-trihidroxi flavona). Estes flavonóides possuem três grupos hidroxilas em sua estrutura principal, tendo, apenas, o posicionamento de um grupo OH como diferença. Apigenina é um fraco seqüestrador do peroxinitrito ( $IC_{50} = 199\mu M$ ), enquanto a galangina é mais potente ( $IC_{50} = 1\mu M$ ). A diferença entre o potencial da apigenina e da galangina, entretanto, entra na relação descrita acima, a qual incorpora dois sítios reativos diferentes (HAENEN et al., 2006).

A explicação para essa relação é que a doação de elétron de um substituto para o oxigênio de um grupo hidroxila fenólico enfraquece a ligação O-H. Isto faz com que seja mais fácil doar um hidrogênio para um peroxinitrito. A doação de hidrogênio é, portanto, o evento principal para o seqüestro de peroxinitrito por um composto fenólico (HAENEN et al., 2006).

A estabilidade de um antioxidante tem forte influência na potência e na persistência do efeito protetor da molécula que atua na célula. A escolha do modelo a ser experimentado, *in vivo* ou *in vitro*, pode ter influência considerável na ação da molécula antioxidante estudada. A maior característica de sistemas-teste *in vivo* é o metabolismo do antioxidante. Isto pode ocorrer próximo ao local de amostragem ou, remotamente, em tecidos distantes. Metabólitos podem variar na estabilidade, nem sempre sendo ativos, mas, algumas vezes, podem contribuir, substancialmente, sob o efeito antioxidante total (BAST; HAENEN, 2002). Existem estudos que mostram que a quantidade de um determinado metabólito chega a exceder o composto principal, mas a atividade antioxidante de ambos são semelhantes (BIEWENGA et al., 1997).

Em ensaios realizados *in vitro*, o metabolismo é, geralmente, ignorado. Mas, infelizmente, em modelos *in vivo*, o mecanismo homeostático pode atenuar a verificação da potência dos compostos testados. Alguns sistemas-teste *in vitro* usam células humanas completas, como eritrócitos, o qual tem sistema homeostático intacto. No entanto, a complexidade do modelo celular pode causar interpretações problemáticas (COLEMAN et al., 2003). É importante notar que a bioavaliabilidade dos antioxidantes determina sua atividade *in vivo*. Atualmente, entretanto, a

relevância de estudos *in vitro* em relação a estudos *in vivo* é incerta (ROSS; KASUM, 2002).

Segundo Haenen et al. (2006), a manutenção, *in vitro*, da concentração adequada de um dado agente antioxidante é problemática, devido a sua instabilidade intrínseca. Os antioxidantes são estruturados para reagir, rapidamente, com espécies oxidantes e, geralmente, são extensivamente oxidados durante uma incubação. Mesmo em curtos períodos de incubação, a concentração pode cair drasticamente. Haenen et al. (2006) mostraram que o flavonóide quercetina teve sua concentração reduzida de 50 para 5  $\mu\text{mol}$  em um período de 6 horas de observação. Como existem alguns trabalhos que aplicam um período de incubação igual ou superior a 48 horas (ZI et al., 1998; ABALEA et al., 1999; LEE et al., 2000), segundo as descrições de Haenen et al. (2006) acima citadas, não haveria, nestes casos, mais quercetina (ou outros antioxidantes) presente no experimento. Para estes mesmos pesquisadores, isto significa que, em estudos que utilizam grandes períodos de exposição, a atividade observada pode não estar, exatamente, relacionada com a concentração inicial do antioxidante. Sendo assim, a concentração é menor que a inicial, indicando que a potência da substância pode estar sendo subestimada.

## 2. Conclusão

Dados epidemiológicos acumulados nos últimos 50 anos mostram um decréscimo nas taxas da maioria das doenças cardíacas, cerebrovasculares e infecciosas. No entanto, as taxas de doenças relacionadas ao câncer mantiveram-se constantes. Sabe-se que o estilo de vida afeta, diretamente, a incidência da doença nos humanos e, atualmente, mesmo com desenvolvimento de tecnologias para produção de novas e mais eficientes drogas, os pesquisadores estão focados na busca de substâncias naturais que possam ser eficazes na eliminação de radicais livres, decorrentes dos processos celulares oxidativos, substâncias estas que são reconhecidos agentes causadores de câncer. Neste contexto, também são estabelecidas certas relações entre os hábitos alimentares com promotores e protetores de doenças. Como exemplo, podemos citar certos alimentos como a carne vermelha e a gordura como prejudiciais à saúde, enquanto frutas, vegetais e fibras são tidas como benéficas.

Os flavonóides são substâncias presentes em alimentos de origem vegetal, que contribuem para a prevenção do câncer, devido às suas propriedades antioxidantes. Vários trabalhos testam a eficácia destes compostos, mas ainda se faz necessária a identificação das fontes vegetais onde estas substâncias possam ser mais encontradas, bem como estimar as concentrações indicadas para o consumo humano. Desta forma, é interessante que se façam mais estudos sobre a relação estrutura/atividade de determinados flavonóides e aprimorem-se os estudos *in vivo* e *in vitro*, visando diferentes estruturas celulares e diferentes condições oxidantes, para que os flavonóides possam ser incorporados, adequadamente, à dieta e serem usados em benefício da saúde humana.

### 3. Agradecimentos

Os autores agradecem à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, e ao Prof. Dr. José Carlos Marconato, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, pela revisão do texto e pelos conselhos.

### 4. Referências

ABALEA, V.; CILLARD, J.; DUBOS, M-P.; SERGENT, O.; CILLARD, P.; MOREL, I. Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 11, pp. 1457-1466, 1999.

AFANAS'EV, I.B.; DOROZHKO, A.; BRODSKII, A.; KOSTYUK, A.; POTAPOVITCH, A. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 38, pp. 1763-1769, 1989.

AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 71, n.10, pp. 1397-1421, 2006.

AREIAS, F.M.; REGO, A.C.; OLIVEIRA, C.R.; SEABRA, R.M. Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe<sup>2+</sup>-induced oxidative stress in cultured retinal cells. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 62, pp. 111-118, 2001.

ASGARY, S.; NADERI, G.H.; SARRAFZADEGAN, N.; GHASSEMI, N.; BOSHTAM, M.; RAFIE, M.; AREFIAN, A. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 73, pp. 223-226, 1999.

BAST, A.; HAENEN, G.R.M.M. The toxicity of antioxidants and their metabolites. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 11, pp. 251-258, 2002.

BIEWENGA, G.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. **General Pharmacology**, Oxford, v. 29, n. 3, pp. 315-331, 1997.

BOOTS, A.W.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 585, pp. 325-337, 2008.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, pp. 343-354, 1990.

BRUNE, M.; ROSSANDER, L.; HALLBERG, L. Iron absorption and phenolic compound: Importance of different phenolic structures. **European Journal of Clinical Nutrition**, Londres, v. 43, pp. 547-558, 1989.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 22, pp. 749-760, 1997.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, pp. 949-962, 1999.

CODY, V. Crystal and molecular structure of flavonoids, In: CODY, V.; MIDDLETON, E. Jr.; HARBORNE, J.B.; BERTZ, A. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medical Properties**, New York, Alan R. Liss, pp. 29-44, 1988.

COLEMAN, M.D.; FERNANDEZ, S.; KHANDERIA, L. A novel clinical monitoring method to evaluate a triple antioxidant combination (Vitamins E, C and  $\alpha$ -lipoic acid) in diabetic volunteers using in vitro methaemoglobin formation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 14, pp. 33-42, 2003.

COULTATE, T.P. **Food: The Chemistry of its Components**. The Royal Society of Chemistry, 2<sup>a</sup> Ed., pp. 137-149, 1990.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, Elmsford, v. 65, pp. 337-353, 1999.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: Potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, Araraquara, v. 28, n. 3, pp. 241-249, 2007.

DUGAS, A.J.; CASTANEDA-ACOSTA, J.; BONIN, G.C.; PRICE, K.L.; FISCHER, N.H.; WINSTON, G.W. Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: Structure-activity relationships. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, pp. 327-331, 2000.

FIRUZI, O.; MLADENKA, P.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; SASO, L. Hypochlorite scavenging activity of flavonoids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Londres, v. 56, pp. 801-807, 2004.

FLORA, S.; IZZOTTI, A.; RANDERATH, K.; RANDERATH, E.; BARTSCH, H.; NAIR, J.; BALANSKY, R.; Van SCHOOTEN, F.; DEGAN, P.; FRONZA, G.; WALSH, D.; LEWTAS, J. DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 366, pp. 197-238, 1996.

GALLI, F.; PIRODDI, M.; ANNETTI, C.; AISA, C.; FLORIDI, E.; FLORIDI, A. Oxidative stress and reactive oxygen species. **Contributions to Nephrology**, v. 149, pp. 240-260, 2005.

GALVEZ, J.; CRUZ, J.; ZARZUELO, A.; CUESTA, F. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. **Pharmacology**, Basel, v. 51, pp. 127-133, 1995.

HAENEN, G.R.M.M.R.R.M.; PAQUAY, J.B.; KORTHOUWER, R.E.; BAST, A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 236, pp. 591-593, 1997.

HAENEN, G.R.M.M.; ARTS, M.J.T.J.; BAST, A.; COLEMAN, M.D. Structure and activity in assessing antioxidant activity in vitro and in vivo: A critical appraisal illustrated with the flavonoids. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 21, pp. 191-198, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, pp. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 18, pp. 125-126, 1995.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 16, pp. 845-850, 1994.

HARA, Y.; LUO, S.J.; WICKRAMASINGHE, R.L.; YAMANISHI, T. Special issue on tea. **Food Reviews International**, New York, v. 11, pp. 371-542, 1995.

HARBORNE, J.B. Flavonoids in the environment: Structure-activity relationships, In: CODY, V.; MIDDLETON, E. Jr.; HARBORNE, J.B.; BERTZ, A. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties**, New York, Alan R. Liss, pp. 17-27, 1988.

HARBORNE, J.B. Nature, distribution and function of plant flavonoids, In: CODY, V.; MIDDLETON, E. Jr.; HARBORNE, J.B.; BERTZ, A. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships**, New York, Alan R. Liss, pp. 15-24, 1986.

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H.; MOSS, G.P. **Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants**, Londres, Taylor & Francis, 2<sup>a</sup> Ed., 998, 1999.

HEIJNEN, C.G.; HAENEN, G.R.M.M.; VEKEMANS, J.A.J.M.; BAST, A. Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure-activity relationship. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 10, pp. 199-206, 2001.

HEIJNEN, C.G.; HAENEN, G.R.M.M.; OOSTVEEN, R.M.; STALPERS, E.M.; BAST, A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. **Free Radical Research**, Londres, v. 36, pp. 575-581, 2002.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. **Nutrition and Cancer**, v. 20, n.1, pp. 21-29, 1993a.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and nine fruits commonly consumed in The Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, pp. 2379-2383, 1992.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; van de PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in tea infusions, wine and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 41, pp. 1242-1246, 1993b.

HORVÁTHOVÁ, K.; CHALUPA, I.; SEBOVÁ, L.; TOTHOVÁ, D.; VACHÁLKOVÁ, A. Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 565, pp. 105-112, 2005.

HUANG, S.W.; FRANKEL, E.N.; GERMAN, J.B. Effect of individual tocopherols and tocopherol in mixtures on the oxidative stability of corn oil tryglicerides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, pp. 2345-2350, 1995.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; HASEGAWA, A.; SHIBATA, M.; OGISO, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 70, pp. 343-347, 1983.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G.O.; SLOWING, K.V.; THOMAS, C.F.; BEECHER, C.W.W. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, **Science**, Washington, v. 275, pp. 218-220, 1997.

KANG, E.M.S. **Dietary flavonoids as protectors from ascorbate-induced oxidative stress in vivo**. 101f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – College of Pharmacy and Nutrition, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canadá, 2007.

KORKINA, L.; AFANAS'EV, I.B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids, In: SIES, H. **Antioxidants in disease. Mechanisms and therapy. Advances in Pharmacology**. San Diego, Academic Press, 707 f., 1997.

KÜHNAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. **World Review of Nutrition and Dietetics**, Basel, v. 24, pp. 117-191, 1976.

KURZER, M.S. Hormonal effects of soy isoflavones: studies in premenopausal and postmenopausal women. **Journal of Nutrition**, v. 130, pp. 660-661, 2000.

LAI, L.S.; CHOU, S.T.; CHAO, W.W. Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, pp. 963-968, 2001.

LEE, H.C.; YIN, P.H.; LU, C.Y.; CHI, C.W.; WEI, Y.H. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. **The Biochemical Journal**, Londres, v. 348, pp. 425-432, 2000.

LIEN, E.J.; REN, S.; BUI, H.; WANG, R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, pp. 285-294, 1999.

LUGASI, A.; HÓVÁRI, J.; SÁGI, K.V.; BÍRÓ, L. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 47, n. 4, pp. 119-125, 2003.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n.5, pp. 529-536, 1996.

MARTÍNEZ-FLORES, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v. 17, n. 6, pp. 271-278, 2002.

MATKOWSKI, A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, pp. 548-560, 2008.

MIDDLETON, E. Jr.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer, In: HARBORNE, J.B. **The Flavonoids: Advances in Research Since 1980**, Londres, Chapman & Hall, pp. 619-652, 1993.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger's Principles of Biochemistry**, New York, Freeman, 4ª Ed., pp. 829, 2004.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, pp. 1100-1103, 2004.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 63, pp. 1995-2018, 1998.

PIERPOINT, W.S. Flavonoids in the human diet, In: CODY, V.; MIDDLETON, E. Jr.; HARBORNE, J.B.; BERTZ, A. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships**, New York, Alan R. Liss, pp. 125-140, 1986.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, pp. 1035-1042, 2000.

REINLI, K.; BLOCK G. Phytoestrogen content of foods: A compendium of literature values. **Nutrition and Cancer**, v. 26, pp. 123-128, 1996.

RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S.; SALVADORI, D.A. Brazilian natural dietary components (annatto, propolis and mushrooms) protecting against mutation and cancer. **Human & Experimental Toxicology**, Hampshire, v. 25, n. 5, pp. 267-272, 2006.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Trends and Plant Science**, New York, v. 20, pp. 933-956, 1996.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 22, pp. 19-34, 2002.

ROUSSEFF, R.L.; MARTIN, S.F.; YOUTSEY, C.O. Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in citrus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 35, pp. 1027-1030, 1987.

SAHU, S.C.; GRAY, G.C. Kaempferol-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 85, pp. 159-164, 1994.

SAVOURET, J.F.; QUESNE, M. Resveratrol and cancer. A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 56, pp. 85-87, 2002.

SICHEL, G.; CORSARO, C.; SCALIA, M.; DI BILIO, A.J.; BONOMO, R.P. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against  $O_2^-$ . **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 11, pp. 1-8, 1991.

SIES, H.; CADENAS, E. Oxidative stress: Damage to intact cells and organs. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, Londres, v. 311, n. 1152, pp. 617-631, 1985.

SIES, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 91, n. 3, pp. S31-S38, 1991.

SUGIHARA, N.; ARAKAWA, T.; OHNISHI, M.; FURUNO, K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linoleic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 27, pp. 1313-1323, 1999.

SWAIN, T. The evolution of flavonoids, In: CODY, V.; MIDDLETON, E. Jr.; HARBORNE, J.B.; BERTZ, A. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships**, New York, Alan R. Liss, pp. 22-26, 1986.

TAKAHAMA, U. Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: Mechanism of antioxidative function. **Phytochemistry**, New York, v. 24, pp. 1443-1446, 1985.

TAPIERO, H.; NGUYEN, B.A.G.; TEW, K.D. Estrogens and environmental estrogens. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, 2002, v. 56, pp. 36-44, 2002a.

TAPIERO, H.; TEW, K.D.; NGUYEN BA, G.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 56, pp. 200-207, 2002b.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 160, pp. 1-40, 2006.

van ACKER, S.A.; van der BERG, D.J.; TROMP, M.N.; GRIFFOEN, D.H.; van BENNEKOM, W.P.; van der VIJGH, W.J.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 20, pp. 331-342, 1996.

YANISHILIEVA, N.V.; KAMAL-ELDIN, A.; MARINOVA, E.M.; TONEVA, A.G. Kinetics of antioxidant action of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols in sunflower and soybean triacylglycerols. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 104, pp. 262-270, 2002.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R.T. Health aspects of functional grape seed constituents. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 15, pp. 422-433, 2004.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, pp. 5165-5170, 2001.

ZI, X.; GRASSO, A.W.; KUNG, H-J.; AGARWAL, R. A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. **Cancer Research**, Baltimore, v. 58, pp. 1920-1929, 1998.

**Avaliação do potencial antimutagênico de extratos etanólicos da própolis verde e de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), por meio de sistema-teste de *Allium cepa*.**

Matheus Mantuanelli Roberto<sup>1</sup>, Cláudia Masrouah Jamal<sup>2</sup>, Osmar Malaspina<sup>1</sup>, Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, CP199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, 29040-090, Vitória, ES, Brasil.

## Resumo

A própolis verde é uma substância resinosa elaborada pelas abelhas, a partir de constituintes vegetais da planta *Baccharis dracunculifolia*, também conhecida como alecrim-do-campo. Atualmente, é crescente o uso do extrato da própolis verde na indústria farmacêutica e na alimentação humana, devido às diversas propriedades biológicas por eles exercidas. Neste trabalho foram avaliados os potenciais anticitotóxico, antigenotóxico e antimutagênico, além dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico, dos extratos etanólicos da própolis verde (EEPV) e de *B. dracunculifolia* (EEBD), usando o sistema-teste de *Allium cepa*, por meio do teste de aberrações cromossômicas (AC) e do micronúcleo (MN), em células meristemáticas e em células da região F<sub>1</sub> das raízes de cebola. Foi avaliada também a constituição química destes extratos. As sementes de *A. cepa*, germinadas em água purificada por osmose reversa, foram pré-tratadas com o EEPV (0,06 µL/mL) e com o EEBD (0,06 µL/mL e 0,30 µL/mL), submetidas ao Metilmetano Sulfonato  $9 \times 10^{-5}$  M (MMS) e expostas ao ensaio de recuperação em água pura. Concomitantemente, sementes foram expostas à água pura (Controle Negativo – CN); ao MMS (Controle Positivo – CP) e à duas concentrações de etanol 70% (0,06 µL/mL e 0,30 µL/mL – Controle do Solvente – CS). Pela comparação dos índices mitóticos (IM) das células meristemáticas, foi observado que este parâmetro não serviu para avaliar a citotoxicidade e anticitotoxicidade dos extratos. Não foi observado qualquer potencial genotóxico e mutagênico para os extratos testados. Após o pré-tratamento com os extratos e a exposição ao MMS, as frequências de AC e MN não foram significativas, indicando que os extratos foram eficazes na redução dos danos promovidos pelo MMS, tanto para as células meristemáticas como para as células F<sub>1</sub>. Aplicando-se a fórmula de porcentagem de redução dos danos, verificamos que a taxa de redução, promovida pelo EEPV e pelo EEBD, variou de 95 a 100%. Assim, inferimos que os extratos utilizados apresentaram um efeito protetor sobre as células de *A. cepa*, contra a reconhecida clastogenicidade do MMS, independentemente do conteúdo de flavonóides presente nestes extratos.

**Palavras-chave:** própolis verde, alecrim-do-campo, aberrações cromossômicas, micronúcleo, cebola.

## 1. Introdução

A própolis tornou-se alvo de intensos estudos farmacológicos e químicos nos últimos 30 anos. Desde o final do século passado, o paradigma relacionado à química da própolis mudou radicalmente. Nos anos 60, pensava-se que a própolis era muito complexa, mas quimicamente constante, como a cera e o veneno de abelhas. Nos últimos anos, a análise de várias amostras de própolis, de diferentes regiões, demonstrou que a composição química é altamente variável (BANKOVA, 2005b). Atualmente, a própolis, especificamente a brasileira, atraiu tanto o interesse comercial quanto o científico (KUMAZAWA et al., 2003).

A própolis é uma substância resinosa elaborada pelas abelhas a partir de diversos constituintes vegetais (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995). As abelhas adicionam enzimas salivares à própolis e o material, parcialmente digerido, é misturado com a cera, sendo esta mistura usada na constituição da colméia (BANKOVA et al., 2000).

Para a produção de própolis, as abelhas utilizam materiais provenientes de vários processos botânicos e diferentes partes das plantas. As substâncias utilizadas na produção de própolis são ativamente secretadas pelas plantas, por exemplo, na forma de exudatos provenientes de um ferimento, materiais lipofílicos de folhas e brotos de folhas, gomas, resinas, látex, etc (CRANE, 1988).

A complexidade e variabilidade química da própolis estão intimamente relacionadas à ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas (BURDOCK, 1998). Atualmente, próximo de 300 componentes, principalmente compostos fenólicos, foram identificados na própolis. A maioria destes compostos isolados pertence a três grandes grupos: flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres, cujas concentrações variam, dependendo da ecoflora da região de coleta (SIMÕES et al., 2004).

A própolis não é apenas um material de construção, mas também é a mais importante “arma química” das abelhas contra microorganismos patógenos e tem sido usado, há muito tempo, como remédio pelos humanos. Atualmente, ainda é um dos remédios mais consumidos nos países balcânicos para tratamento de ferimentos, queimaduras e de úlceras estomacais, sendo também utilizado como antisséptico bucal (BANKOVA, 2005b). Devido ao seu amplo espectro de atividades

biológicas, é utilizado em alguns países, em alimentos, bebidas e na medicina popular (BANKSOTA et al., 2000).

Os constituintes da própolis e a atividade de determinado extrato, diferem consideravelmente, de acordo com o método de extração (BURDOCK, 1998). Segundo alguns autores (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998; CASTALDO; CAPASSO, 2002; PEREIRA et al., 2002; SALATINO et al., 2005; MENEZES, 2005), a própolis possui diversas atividades biológicas, que vão desde ação antiinflamatória até anticarcinogênica.

Foi demonstrado por Varanda et al. (1999) um efeito antimutagênico para o extrato etanólico da própolis sobre *Salmonella typhimurium* (linhagens TA102, TA 100 e TA98), no qual o extrato inibiu o potencial mutagênico da daunomicina (TA102), benzo[a]pireno (TA100) e aflatoxina B1 (TA98). Os autores concluíram que a atividade antimutagênica do extrato pode ser devido à presença de flavonóides, uma vez que estes compostos apresentam reconhecida atividade antioxidante.

A própolis de região temperada contém, predominantemente, compostos fenólicos, incluindo flavonóides e derivados de ácido cinâmico (MARCUCCI, 1995). Já os diterpenos e compostos prenilatados estão ausentes na própolis de região temperada, mas presentes na própolis tropical da América do Sul. Essa última contém lignanas, flavonóides e outras classes de compostos fenólicos. A diferença de composição da própolis das zonas temperadas e das tropicais é basicamente decorrente de diferenças de vegetações destas regiões (BANKOVA et al., 2000).

Pelo motivo da própolis ser uma mistura complexa de substâncias e a própolis brasileira possuir compostos específicos, pesquisadores vêm investigando, cada vez mais, estes compostos para se conhecer a principal origem botânica de cada amostra de própolis coletada na região tropical. Diferentes trabalhos, utilizando-se metodologias diversificadas, identificaram a planta *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como alecrim-do-campo ou vassourinha, como a fonte de coleta das abelhas para a produção de um dos tipos de própolis brasileira, conhecido como própolis verde (KUMAZAWA et al., 2003; PARK et al., 2004; VERDI et al., 2005; ALENCAR et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005). Este tipo de própolis é originário da região de cerrado do sul do estado de Minas Gerais e norte de São Paulo (PARK et al., 2004; ALENCAR et al., 2005).

Tendo em vista os aspectos supracitados, este trabalho teve como objetivo caracterizar a constituição química e avaliar o potencial antimutagênico e

mutagênico dos extratos etanólicos da própolis e do alecrim-do-campo, bem como avaliar a potencialidade do uso do sistema-teste de *A. cepa*, especificamente testes de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células meristemáticas e  $F_1$ , como ferramenta aplicável para testes de antimutagenicidade.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Origem da própolis e sua fonte botânica**

As amostras de própolis verde e de *B. dracunculifolia* foram obtidas junto ao Apiário Floresta Comércio Importação e Exportação Ltda., coletadas na cidade de Carvalhópolis, no sul do estado de Minas Gerais, Brasil.

O material coletado foi acondicionado em recipiente fechado e mantido no escuro, até seu processamento.

### **2.2. Preparação do extrato etanólico da própolis (EEPV)**

Para a obtenção do extrato etanólico da própolis, foram utilizados 30 g da própolis bruta triturada. À própolis triturada foi adicionado etanol 70%, até completar o volume de 100 mL. Deste modo, obteve-se uma relação de 30% de própolis para 70% de álcool.

Essa mistura foi colocada em um balão de fundo chato que passou por um processo chamado extração a quente sob refluxo simples, que consiste no aquecimento do balão ligado a um condensador de bolas, durante um período de 6 horas. Após este tempo, o extrato obtido foi filtrado, a quente, resfriado e colocado em uma proveta de 100 mL, para decantar a cera em suspensão. O extrato foi novamente filtrado para a retirada da cera e, finalmente, o volume foi completado com álcool 70%, para corrigir o volume de álcool evaporado durante o processo de extração. Desta forma obteve-se um extrato etanólico de própolis a 31,4%, calculado pela densidade do extrato sobre a densidade do solvente.

### **2.3. Preparação do extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* (EEBD)**

Para a obtenção do extrato etanólico do alecrim-do-campo, foram utilizados 30 g de folhas jovens e gemas da planta, secos e macerados. À este material foi adicionado etanol 70%, até completar o volume de 100 mL. Deste modo, obteve-se

uma relação similar à da própolis para o alecrim-do-campo, porém a concentração do EEED, pelos cálculos de densidade, foi de 33,8%.

O procedimento seguiu semelhantemente à preparação do EEPV, diferindo apenas na ausência do período de decantação, pois, tratando-se de um extrato vegetal, não há quantidade significativa de cera presente.

O etanol foi escolhido como solvente, pois, de acordo com Burdock (1998), o extrato etanólico é a forma mais usual de utilização da própolis.

#### **2.4. Caracterização fitoquímica dos extratos etanólicos**

Os extratos etanólicos de própolis verde e do alecrim-do-campo foram caracterizados por reações químicas desenvolvidas no laboratório do departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). As análises foram realizadas em relação às seguintes substâncias naturais: flavonóides (reação com  $\text{AlCl}_3$ ), cumarinas (reação com  $\text{KCl}$ ), alcalóides (reagente de Dragendorff), saponinas (teste de espuma), esteróides e triterpenóides (reação de Liebermann-Buchard) (COSTA, 1982).

#### **2.5. Determinação da quantidade total de flavonóides dos extratos etanólicos**

Após a obtenção dos extratos etanólicos, como descrito acima, foram quantificados os flavonóides totais do EEPV e do EEED. A determinação da quantidade de flavonóides totais foi realizada baseada no padrão de quercetina, de acordo com Woisky (1996 apud MARCUCCI et al., 1998) e Woisky; Salatino (1998), com pequenas modificações, como segue: foram colocados 5,0 mL de etanol absoluto em um tubo de ensaio, adicionando 5  $\mu\text{L}$  de cada amostra, separadamente, e em seguida, 100  $\mu\text{L}$  do reagente  $\text{AlCl}_3$  (solução de 2% em metanol).

Após agitação por 5 segundos e um repouso na ausência de luz por 30 minutos (para que não houvesse a degradação da amostra), as soluções foram lidas em espectrofotômetro em  $\lambda = 425 \text{ nm}$ .

#### **2.6. Cromatografia em camada delgada (CCD)**

Para a obtenção dos perfis cromatográficos por CCD e determinação dos tipos de terpenos, compostos fenólicos simples e flavonóides presentes nos extratos

etanólicos de própolis verde e do alecrim-do-campo, foram utilizados reveladores específicos para cada classe de compostos (WAGNER et al., 1984).

## **2.7. Determinação de sólidos solúveis totais**

Os sólidos solúveis totais, medidos em graus Brix (°Bx), presentes nos extratos etanólicos, foram determinados utilizando-se um refratômetro de Abbe.

## **2.8. Sistema-teste de Allium cepa**

O material biológico utilizado neste estudo, como sistema-teste vegetal, para avaliação dos efeitos antimutagênicos dos extratos da própolis verde e de *B. dracunculifolia*, foi constituído de sementes de *Allium cepa* (2n = 16 cromossomos) de um mesmo lote e mesma variedade (cebola baia periforme).

Sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em água purificada por osmose reversa, em estufa a 24°C, até que as raízes atingissem, aproximadamente, 0,5 cm de comprimento. Após este procedimento, uma parte das raízes foi transferida para placas de Petri contendo a diluição do extrato da própolis (0,06 µL/mL) ou as diferentes concentrações do extrato de alecrim-do-campo (0,06 µL/mL e 0,30 µL/mL), sendo uma placa de Petri para cada tratamento. Uma segunda amostra das raízes foi submetida à solução de Metilmetano Sulfonato  $9 \times 10^{-5}$  M (MMS), para o teste controle positivo (CP). Outra amostra das raízes foi submetida à solução de água e álcool 70%, na proporção de álcool semelhante à utilizada na preparação dos extratos, para o teste de controle da ação do álcool como solvente (controle solvente - CS). O restante do material permaneceu, continuamente, em água pura (controle negativo - CN). Transcorrido o tempo de 24 horas dos testes, parte das raízes de todos os ensaios foi coletada e fixada em Carnoy (3 partes de etanol para 1 de ácido acético – v:v). Outra parte foi transferida para outras placas, também separada por tratamentos, contendo o MMS. Depois de mais um período de 24 horas, amostras das raízes foram coletadas e fixadas, enquanto o restante delas foi submetido a um período de recuperação em água pura, por mais 24 horas. Parte das raízes do CP e do CS, que estavam nas placas, foi coletada enquanto o restante também passou pelo processo de recuperação em água pura. Ao final da exposição, todas as raízes foram coletadas, fixadas em Carnoy e armazenadas em geladeira, até a confecção das lâminas.

Sendo assim, para cada coleta dos tratamentos, também houve uma coleta dos controles (CN, CS e CP). Todos os ensaios foram realizados, simultaneamente e em duplicatas (duas réplicas).

Os meristemas radiculares, previamente fixados, foram lavados em água destilada por 5 minutos e hidrolisados em HCl 1N a 60°C por 10 minutos. Após nova lavagem em água destilada, as raízes foram submetidas ao reativo de Schiff por, aproximadamente, 2 horas.

Com os meristemas corados e lavados em água corrente, foram confeccionadas 10 lâminas de cada tratamento, para a avaliação de possíveis presenças de aberrações cromossômicas e micronúcleos, levando-se em conta a porcentagem de ocorrência de cada uma delas. Em cada lâmina foram analisadas, aproximadamente, 500 células da região meristemática. Quando este número foi excedido, o valor foi corrigido, matematicamente, para 500 células, totalizando exatas 5.000 células por tratamento. Este mesmo procedimento foi utilizado para a análise das células da geração F<sub>1</sub>. A observação foi feita em microscopia de luz, sob o aumento de 400x.

Para a análise dos efeitos citotóxicos, foi analisado o índice mitótico (IM), utilizando-se a seguinte relação:

$$IM = \frac{n^{\circ} \text{ de células em divisão}}{n^{\circ} \text{ de células observadas}} \times 100$$

Para a análise dos efeitos mutagênicos e antimutagênicos, sobre as células meristemáticas, foram observadas e anotadas todas as ocorrências de micronúcleos e quebras cromossômicas. Este parâmetro também foi avaliado sobre células da geração F<sub>1</sub>, considerando apenas, o número de micronúcleos. Para os efeitos genotóxicos e antigenotóxicos, foram observados os possíveis tipos de aberrações cromossômicas encontradas nas células meristemáticas de todas as lâminas de cada tratamento (brotos nucleares, células binucleadas, células poliplóides, aderências cromossômicas, C-metáfases, perda de cromossomos, pontes cromossômicas, anáfases multipolares, anáfases multipolares e com ponte).

Todos os resultados obtidos foram avaliados pelo teste estatístico Mann-Whitney, seguindo o nível de significância de 0,05.

Visando facilitar o entendimento dos resultados, eles foram divididos de acordo com o tipo de substância à qual as raízes de cebola foram expostas:

- Tratamento com os extratos etanólicos: sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em água purificada pelo processo de osmose reversa e, depois, submetidas aos controles e aos tratamentos com os diferentes extratos etanólicos. Esta etapa do teste foi realizada para verificar os possíveis efeitos da exposição aos extratos, ou seja, avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade induzida por eles.
- Tratamento com o agente mutagênico: parte das sementes de cebola, previamente submetida aos extratos etanólicos, foi exposta ao MMS por um período de 24 horas para avaliar os potenciais anticitotóxico, antigenotóxico e antimutagênico destes compostos.
- Ensaio de recuperação: depois de pré-tratadas e submetidas ao MMS, o restante das raízes de cebola foi submetido à água purificada por osmose reversa, por um período de recuperação de 24 horas. Recomenda-se a realização do ensaio de recuperação para avaliar um possível efeito residual dos extratos etanólicos na proteção celular, ou seja, para verificar se os extratos exibem efeito apenas quando as raízes estão expostas a eles ou se este efeito pode ser prolongado.

### **2.9. Determinação do efeito antimutagênico**

A atividade antimutagênica foi avaliada pela análise da porcentagem de redução de danos para cada um dos tratamentos com os extratos etanólicos da própolis verde e do alecrim-do-campo. Para determinar esta porcentagem, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Redução (\%)} = \frac{a - b}{a - c} \times 100$$

Onde: a = número de células micronucleadas ou com quebra cromossômica presentes no CP;  
b = Número de células micronucleadas ou com quebra cromossômica presentes nos tratamentos;  
c = número de células micronucleadas ou com quebra cromossômica presentes no CN.

## **3. Resultados**

### **3.1. Determinação da quantidade total de flavonóides dos extratos etanólicos**

A quantidade total de flavonóides encontrada no extrato etanólico da própolis verde, medida pelo padrão de quercetina, foi de 3,65% (m/m). Para o extrato

etanólico de *Baccharis dracunculifolia* a quantidade foi de 0,67% (m/m), utilizando-se a mesma metodologia.

### 3.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As classes de metabólitos secundários mais freqüentemente encontradas nos dois extratos avaliados foram compostos fenólicos simples, flavonóides e triterpenos.

As análises por CCD, baseadas na comparação do R<sub>f</sub> (fator de retenção) das amostras, em relação ao R<sub>f</sub> de padrões específicos, possibilitaram a identificação dos seguintes compostos (Figura 1):

- No extrato de *B. dracunculifolia* foram detectados: ácido ferúlico, ácido caféico, canferol, rutina e quercetina.
- No extrato de própolis verde foram detectados: ácido ferúlico, ácido caféico, rutina e quercetina.

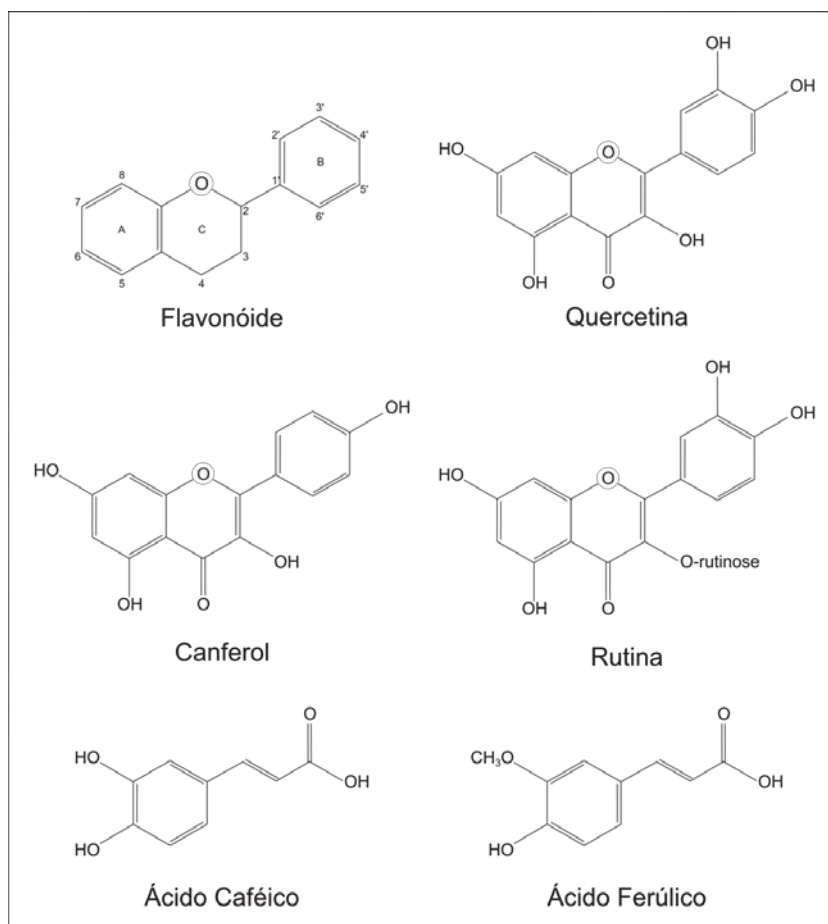


**Figura 1:** Fórmulas químicas estruturais dos compostos fenólicos encontrados nos extratos etanólicos, por meio de CCD. Estrutura básica de um flavonóide e os diferentes compostos fenólicos encontrados nos extratos etanólicos. A quercetina e o canferol pertencem à classe dos flavonóis. A rutina pertence ao grupo das flavonas derivadas, também conhecidas como bioflavonóides. Os ácidos caféico e ferúlico são denominados ácidos fenólicos.

Não foi possível determinar a quantidade específica de cada composto devido à similaridade de suas fórmulas estruturais.

### 3.3. Determinação dos sólidos solúveis totais

Os sólidos solúveis totais, presentes no extrato etanólico da própolis foi equivalente a 35°Bx, enquanto para o extrato etanólico do alecrim-do-campo foi igual a 25°Bx, ambos com valores superiores ao mínimo indicado pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (11°Bx ou 11% de extrato seco) (BRASIL, 1998).

### 3.4. Tratamento com os extratos etanólicos

Para os resultados de citotoxicidade (Figura 2), foi observado que houve uma queda dos índices mitóticos para todos os tratamentos, em relação ao índice do CN, cujos valores foram, de maneira geral, diferentes estatisticamente do teste controle.

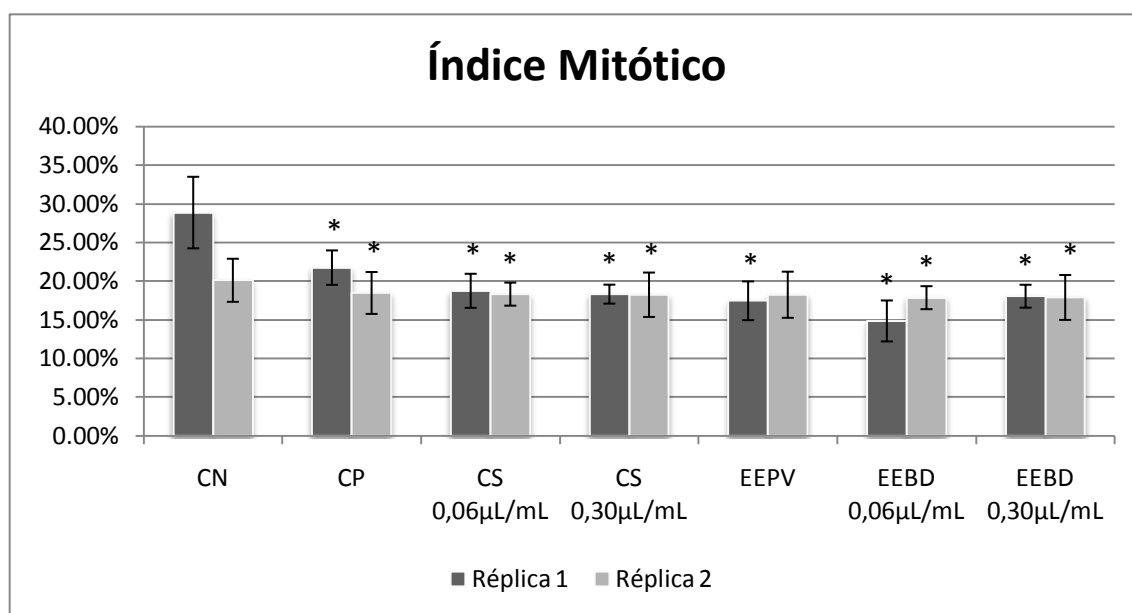


**Figura 2:** Índice mitótico observado para as células de meristemas radiculares de *Allium cepa*. CN: controle negativo; CP: controle positivo (MMS); CS: controle do solvente (etanol); EEPV: extrato etanólico da própolis verde; EEBD: extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*. \* significativo ( $p < 0,05$ ).

Os resultados relativos à genotoxicidade, para todos os tratamentos de ambas as réplicas, mostraram-se não significativos em relação ao controle negativo (Figura 3).

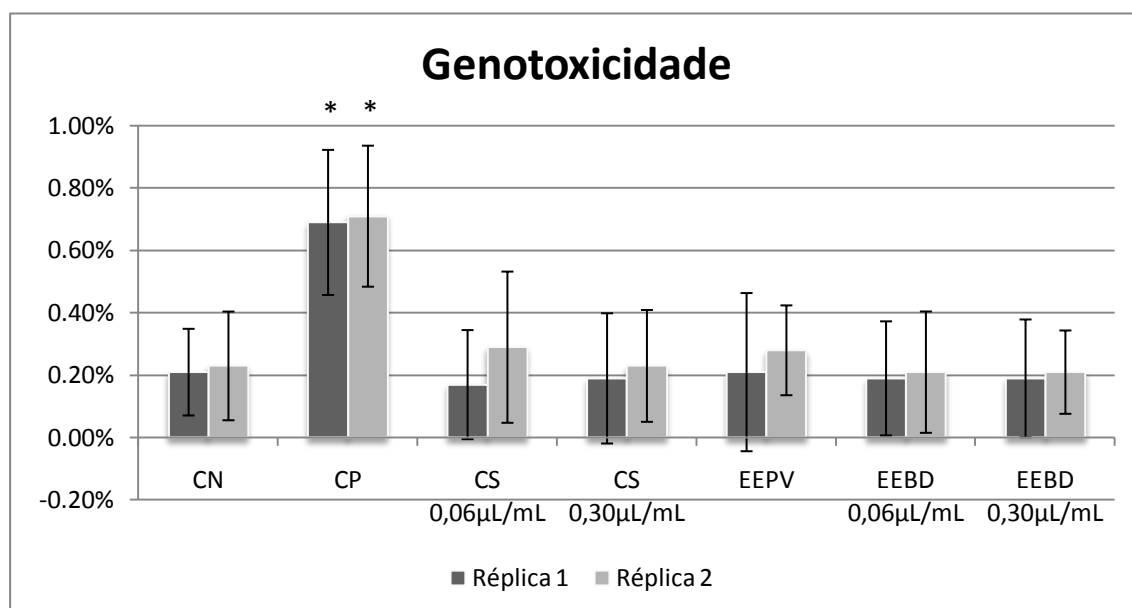


**Figura 3:** Frequência de aberrações cromossômicas observada nas células de *Allium cepa*. CN: controle negativo; CP: controle positivo (MMS); CS: controle do solvente (etanol); EEPV: extrato etanólico da própolis verde; EEBD: extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*. \* significativo ( $p < 0,05$ ).

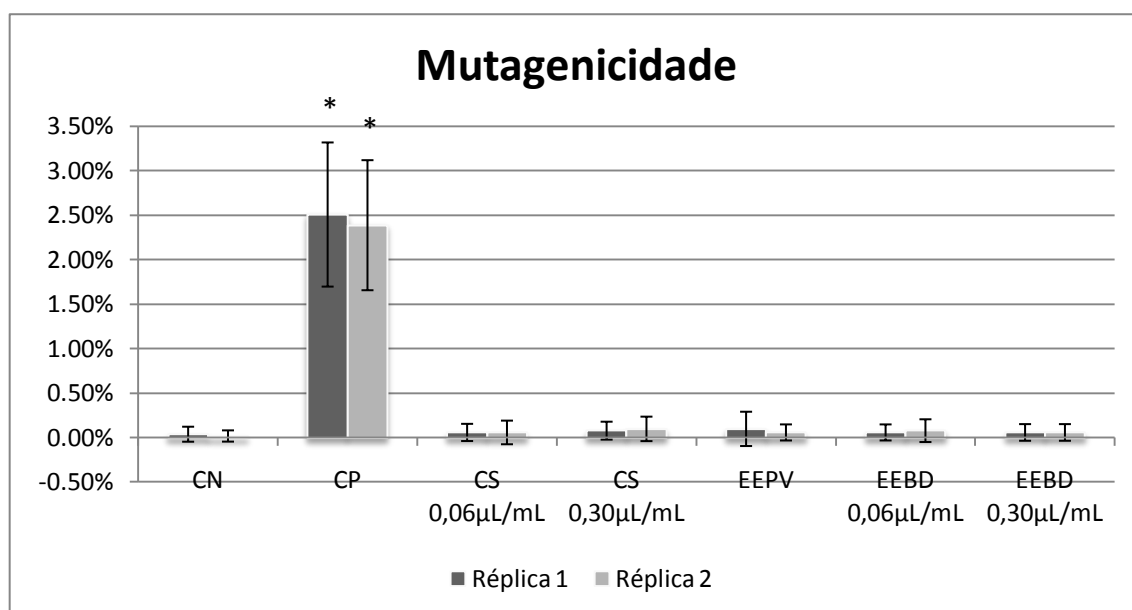


**Figura 3:** Frequência de micronúcleos e quebras cromossômicas obtida para o sistema-teste de *Allium cepa*. CN: controle negativo; CP: controle positivo (MMS); CS: controle do solvente (etanol); EEPV: extrato etanólico da própolis verde; EEBD: extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*. \* significativo ( $p < 0,05$ ).

Em relação à presença de micronúcleos nas células meristemáticas e da geração  $F_1$ , os resultados foram significativos, apenas para o controle positivo (Figura 4 e 5).

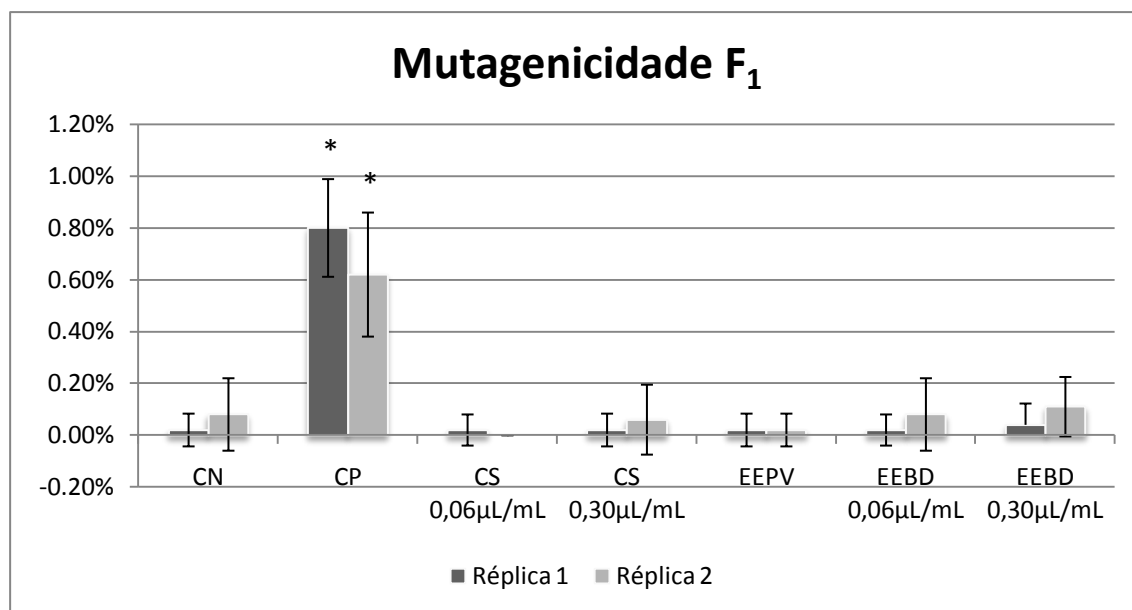


**Figura 4:** Frequência de micronúcleos observada nas células da geração F<sub>1</sub> das raízes de *Allium cepa*. CN: controle negativo; CP: controle positivo (MMS); CS: controle do solvente (etanol); EEPV: extrato etanólico da própolis verde; EEBD: extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*. \* significativo ( $p < 0,05$ ).

### 3.5. Tratamento com o agente mutagênico

Em relação ao potencial anticitotóxico dos extratos etanólicos, novamente foi observada uma discrepância entre os valores dos índices mitóticos do CN entre a réplica 1 e a réplica 2. Os baixos índices mitóticos do CN podem ser a causa das diferenças estatísticas registradas para este tratamento.

Para a réplica 1, os resultados referentes à anticitotoxicidade demonstraram baixos índices mitóticos do CN e do CP, e altos índices mitóticos das raízes expostas à solução etanólica (CS) e, por isto, estes últimos foram significativos estatisticamente. Os índices mitóticos para os tratamentos com o EEPV e com o EEBD 0,06 µL/mL foram parecidos e não-significativos, quando comparados com o CN. No entanto, o índice mitótico do EEBD, para a concentração de 0,30 µL/mL, foi ainda menor que a registrada para a concentração de 0,06 µL/mL, sendo este resultado estatisticamente diferente do CN (Figura 6).

Para a réplica 2, apenas os tratamentos com os extratos etanólicos apresentaram resultados significativamente diferentes do CN. Os valores dos índices mitóticos do CP e dos CS, não diferiram do CN (Figura 6).

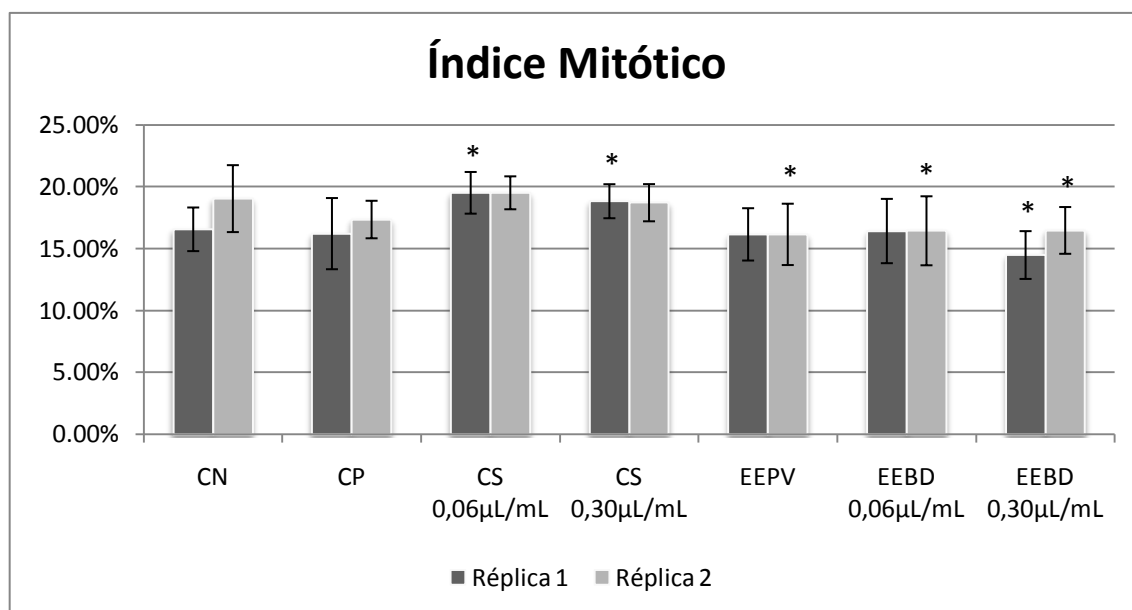


**Figura 5:** Índice mitótico observado para as células de meristemas radiculares de *Allium cepa*, pré-tratados com os extratos etanólicos e coletados após exposição sucessiva ao MMS. CN: controle negativo; CP: controle positivo (MMS); CS: controle do solvente (etanol); EEPV: extrato etanólico da própolis verde; EEBD: extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*. \* significativo ( $p < 0,05$ ).

Em relação ao potencial antigenotóxico, as freqüências de aberrações cromossômicas, observadas nos CN das réplicas 1 e 2, foram semelhantemente baixas. Para o CP, foram observados valores significativos de aberrações cromossômicas, em ambas as réplicas, em relação ao CN (Figura 7).

Para o CS, apenas a solução da concentração mais alta (0,30µL/mL) da réplica 2 exibiu genotoxicidade. Nas células meristemáticas pré-tratadas com o EEPV, não foi observada freqüência significativa de aberrações cromossômicas. Os resultados para o tratamento com o EEBD, em ambas as concentrações, também não foram estatisticamente significativos, apesar de se observar uma freqüência de aberrações cromossômicas um pouco maior para as raízes pré-tratadas com a maior concentração (0,30 µL/mL).

Em relação à freqüência de micronúcleos e quebras cromossômicas, apenas o CP exibiu valores de significância estatística em relação ao CN (Figura 8).

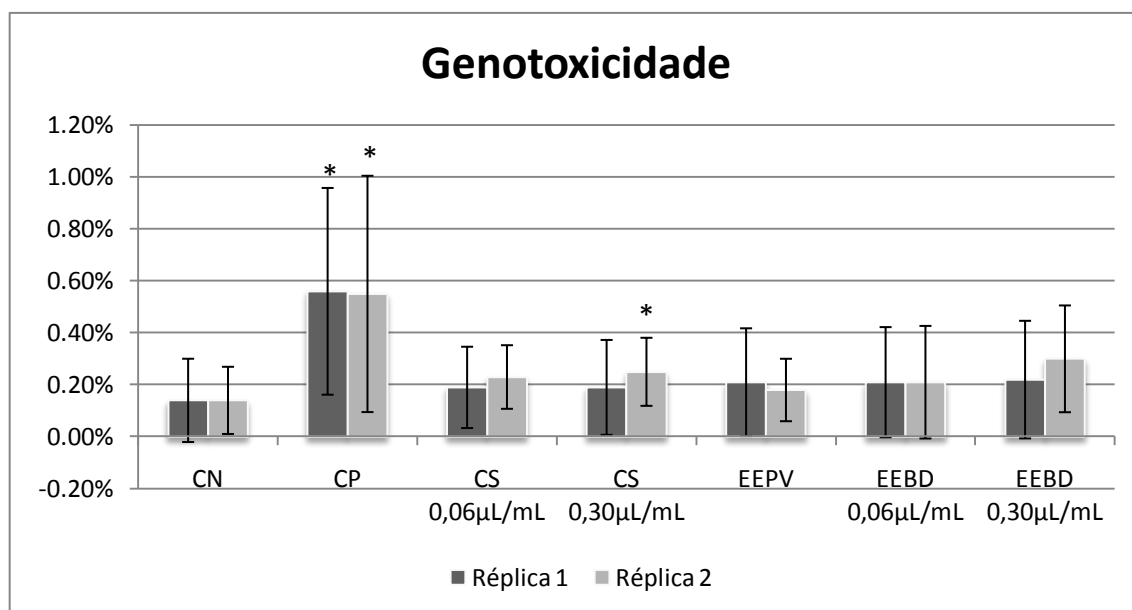


**Figura 6:** Frequência de aberrações cromossômicas observada para as células de meristemas radiculares de *Allium cepa*, pré-tratados com os extratos etanólicos e coletados após exposição sucessiva ao MMS. CN: controle negativo; CP: controle positivo (MMS); CS: controle do solvente (etanol); EEPV: extrato etanólico da própolis verde; EEBD: extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*. \* significativo ( $p < 0,05$ ).

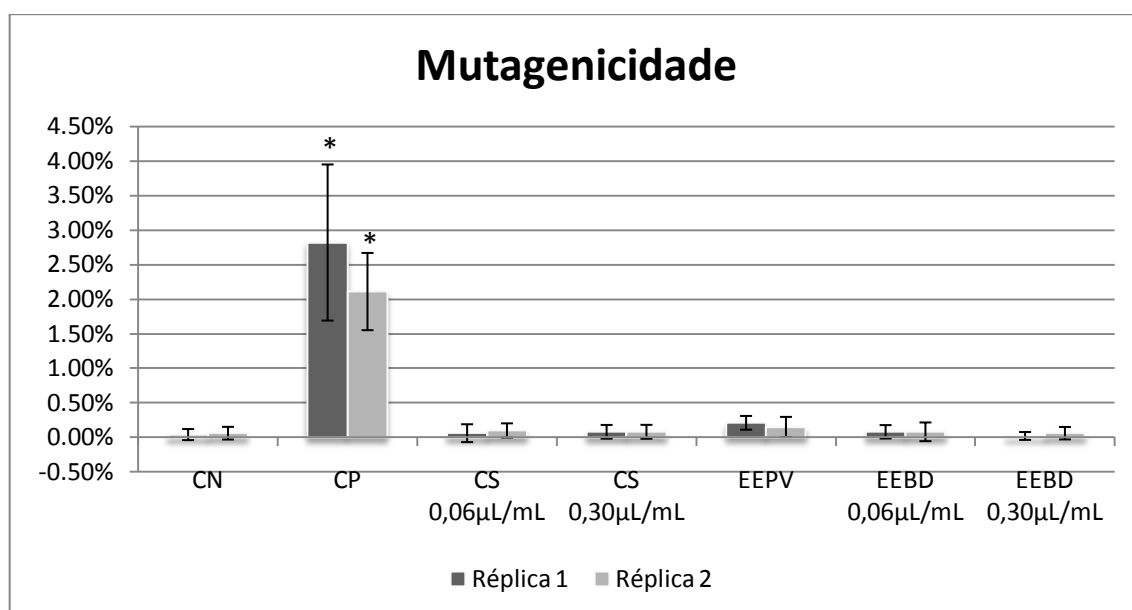


**Figura 7:** Frequência de micronúcleos e quebras cromossômicas observada para as células de meristemas radiculares de *Allium cepa*, pré-tratados com os extratos etanólicos e coletados após exposição sucessiva ao MMS. CN: controle negativo; CP: controle positivo (MMS); CS: controle do solvente (etanol); EEPV: extrato etanólico da própolis verde; EEBD: extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*. \* significativo ( $p < 0,05$ ).

Em relação à frequência de micronúcleos observada na região de células da geração  $F_1$  de raízes de cebola, referentes a esta mesma coleta, foi observado também que apenas o CP exibiu valores significativos em relação ao CN (Figura 9).

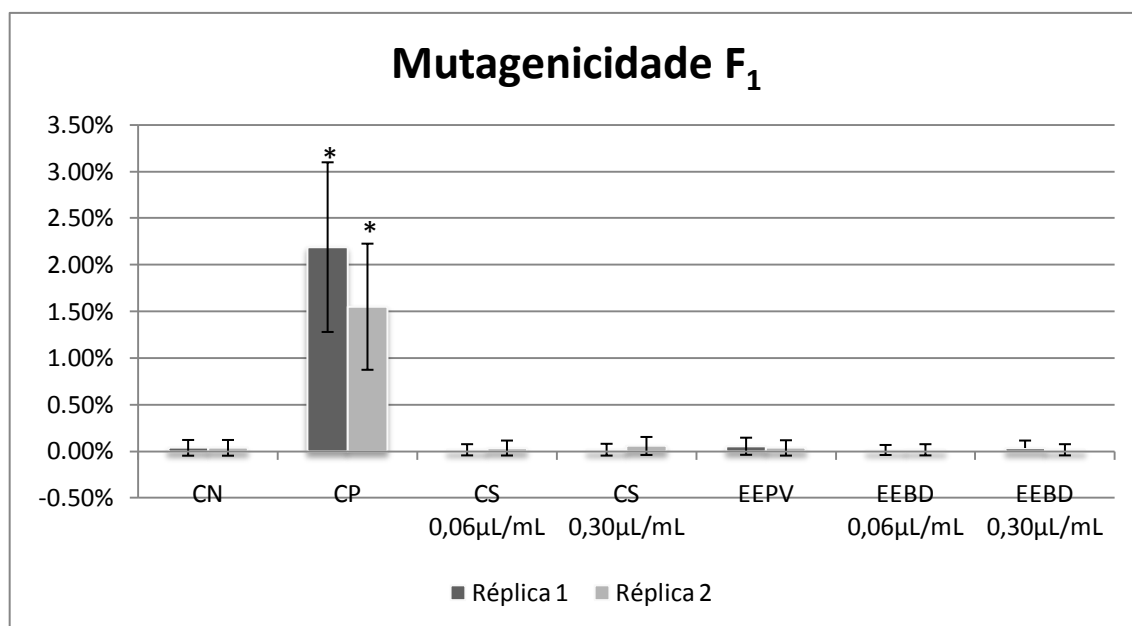


**Figura 8:** Frequência de micronúcleos observada para as células da geração F<sub>1</sub> de *Allium cepa*, pré-tratadas com os extratos etanólicos e coletados após exposição sucessiva ao MMS. CN: controle negativo; CP: controle positivo (MMS); CS: controle do solvente (etanol); EEPV: extrato etanólico da própolis verde; EEBD: extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*. \* significativo ( $p < 0,05$ ).

Pela aplicação da fórmula de redução de porcentagem de danos, utilizada para a verificação da antimutagenicidade, foi observado que, para a concentração 0,06 µL/mL de EEBD e EEPV, houve uma eficácia similar entre os dois extratos (réplica 1: 98,61% para ambos; réplica 2: 95,24% para EEPV e 98,80% para EEBD). Para a concentração de 0,30 µL/mL do EEBD, o valor observado de redução de dano foi sutilmente superior (réplica 1 e 2: 100%) aos demais valores registrados.

### 3.6. Ensaio de recuperação

Pelos resultados de índice mitótico, obtidos após o período de recuperação (Figura 10), observa-se que todos os tratamentos apresentaram valores superiores aos observados para o CN. Para a réplica 1, apenas as raízes do CP e do EEBD (0,30 µL/mL) exibiram índices mitóticos não significativos em relação ao CN. Já para a réplica 2, os índices mitóticos do CP, do CS (0,06 µL/mL) e de ambas as concentrações do EEBD apresentaram valores não significativos em relação ao CN.

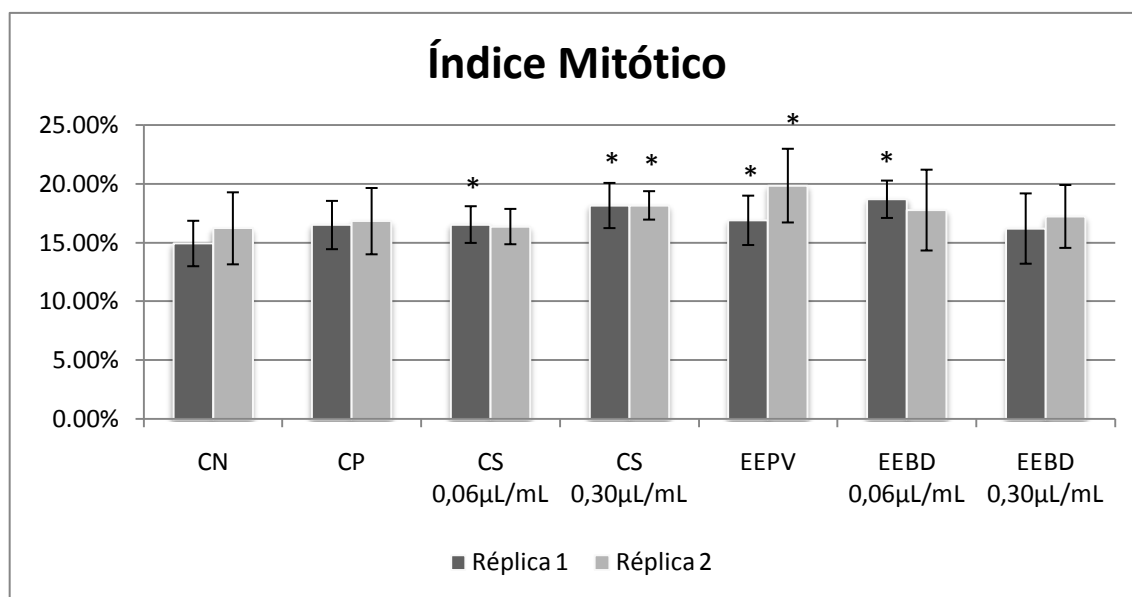


**Figura 9:** Índice mitótico das células meristemáticas de *Allium cepa*, depois do ensaio de recuperação. CN: controle negativo; CP: controle positivo (MMS); CS: controle do solvente (etanol); EEPV: extrato etanólico da própolis verde; EEBD: extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*. \* significativo ( $p < 0,05$ ).

Em relação à genotoxicidade, apenas o CP e o CS (0,30 µL/mL) da réplica 2 apresentaram freqüências significativas de aberrações cromossômicas, em relação ao CN. Nenhum dos tratamentos com os extratos etanólicos mostrou-se genotóxico, até mesmo após o período de recuperação (Figura 11).

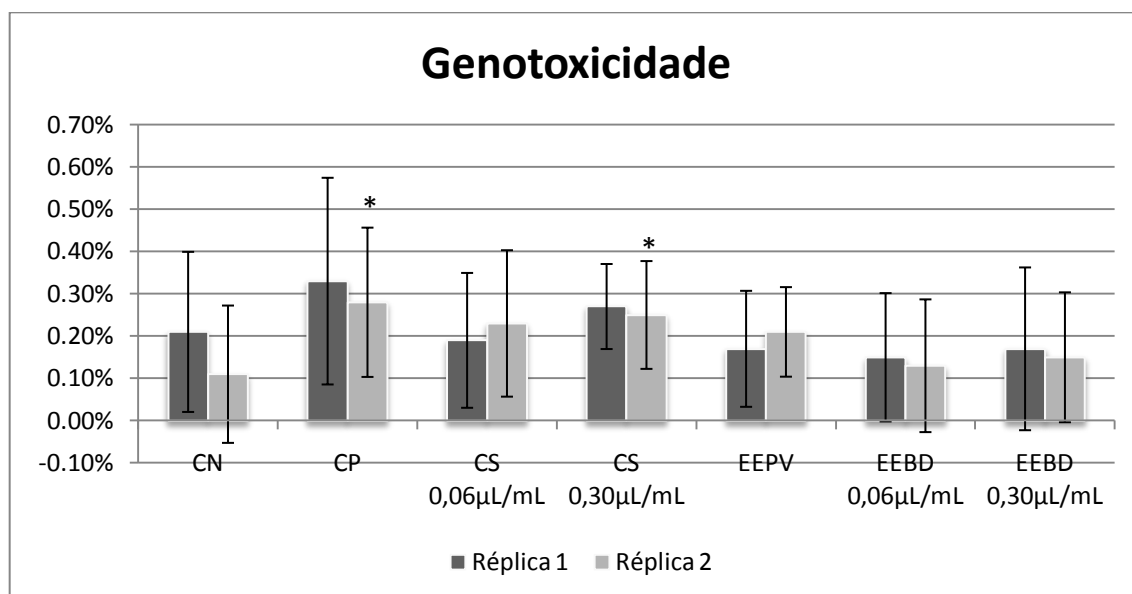


**Figura 10:** Freqüência de aberrações cromossômicas observada para as células de meristemas radiculares de *Allium cepa*, após o período de recuperação. CN: controle negativo; CP: controle positivo (MMS); CS: controle do solvente (etanol); EEPV: extrato etanólico da própolis verde; EEBD: extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*. \* significativo ( $p < 0,05$ ).

Quanto à mutagenicidade, apenas o CP, de ambas as réplicas, apresentou resultados com diferenças significativas em relação ao CN (Figura 12).

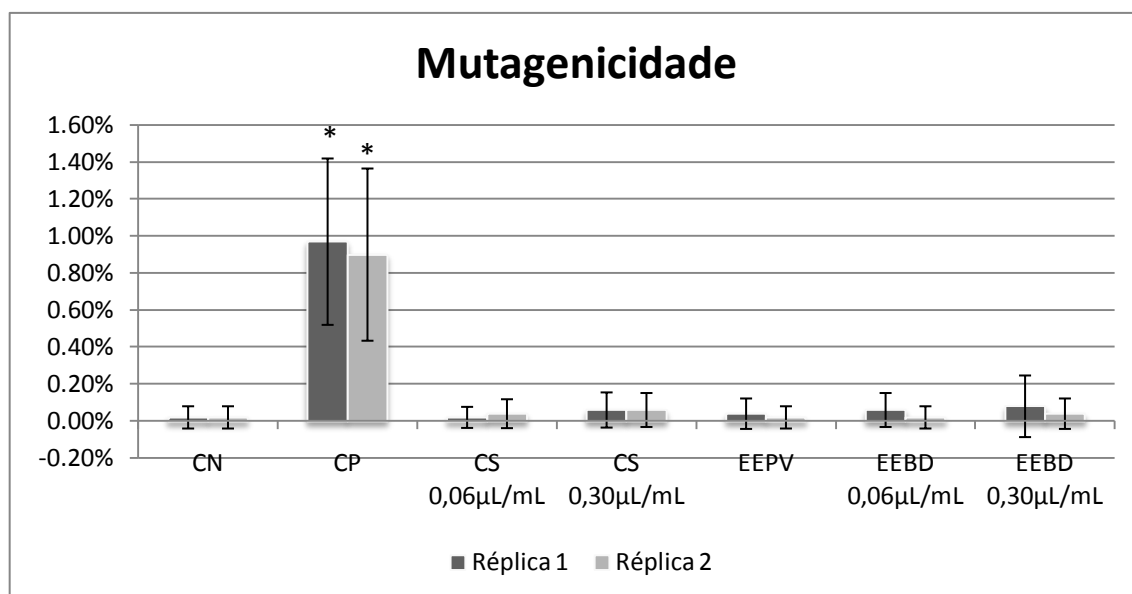


**Figura 11:** Frequência de micronúcleos e quebras cromossômicas observada para as células de meristemas radiculares de *Allium cepa*, após o período de recuperação. CN: controle negativo; CP: controle positivo (MMS); CS: controle do solvente (etanol); EEPV: extrato etanólico da própolis verde; EEED: extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*. \* significativo ( $p < 0,05$ ).

Os resultados para a presença de micronúcleos exibidos pelas células da região  $F_1$  mostraram-se significativos apenas para o CP das duas réplicas (Figura 13). Em relação aos tratamentos, nenhum extrato exibiu frequência significativa desta alteração, em relação ao CN.

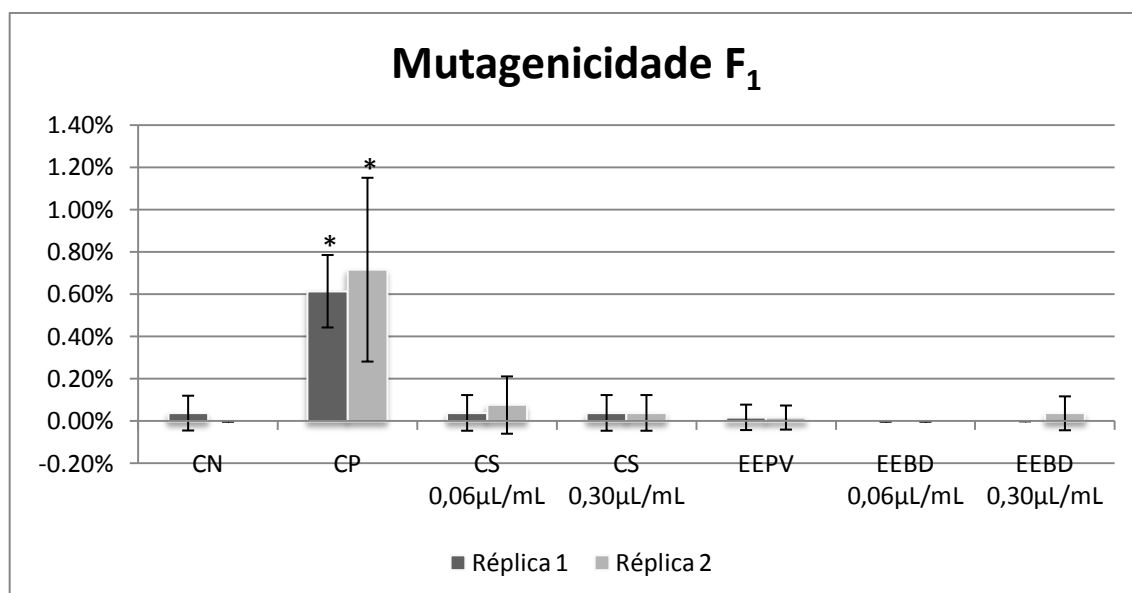


**Figura 12:** Frequência de micronúcleos observada para as células da geração  $F_1$  de *Allium cepa*, após o período de recuperação. CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo com o MMS; CS: Controle do Solvente (etanol); EEPV: Extrato etanólico da própolis verde; EEED: extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia*. \* significativo ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

Foram testados o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de extratos etanólicos da própolis verde e de alecrim-do-campo, este último testado em duas concentrações diferentes. Também foram testados o potencial anticitotóxico, antigenotóxico e antimutagênico destes mesmos extratos, por meio do sistema-teste de *Allium cepa*. Não existe na literatura, com exceção de um estudo feito por Roberto (2006), qualquer avaliação de antigenotoxicidade e/ou antimutagenicidade utilizando-se este sistema-teste, ou até mesmo outros sistemas-teste vegetais. Desta forma, as ações e efeitos destes extratos foram associados com os resultados de outros autores, que utilizaram diversos organismos, tanto em testes *in vivo* quanto *in vitro*. Esta análise também serve de referência sobre a efetividade da utilização do sistema-teste de *A. cepa* em ensaios de antimutagenicidade, apontando mais um sistema-teste com potencialidade de uso neste tipo de avaliação.

Pelos resultados obtidos, foi possível observar a eficácia da substância usada no controle positivo (MMS), na indução de mutagenicidade (tanto em células meristemáticas quanto células da geração F<sub>1</sub>) e de genotoxicidade, no sistema-teste de *A. cepa*, pois todos os resultados foram positivos em relação aos dados do controle negativo. Esses resultados corroboram com as afirmações de outros autores (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008a e 2008b), que utilizaram o MMS como controle positivo.

Os ensaios de citotoxicidade realizados com o sistema-teste de *A. cepa*, para os extratos etanólicos da própolis e do alecrim-do-campo, não apresentaram dados consistentes, pois foi observada uma discrepância entre valores de índices mitóticos obtidos nas réplicas. Esses dados corroboram as citações de Matsumoto; Marin-Morales (2004), Matsumoto et al. (2006), Fernandes et al. (2007) e Pedro (2008) de que o índice mitótico, muitas vezes, pode não se caracterizar em um bom *end point* de citotoxicidade.

Pelos resultados de genotoxicidade e mutagenicidade, pode-se inferir que, tanto o controle com solvente (CS) quanto os tratamentos com os extratos, não induziram aberrações cromossômicas e micronúcleos para o sistema-teste de *A. cepa*. Desta forma, também não foram encontradas frequências significativas de micronúcleos nas células da geração F<sub>1</sub> de raízes de cebola.

Segundo Phillips; Jenkinson (2001), muitos trabalhos apontam que o etanol, de maneira geral, não induz efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos tanto em testes *in vivo* e quanto *in vitro*. Os efeitos de genotoxicidade/mutagenicidade são positivos, apenas, quando a concentração alcoólica encontra-se muito alta ou quando o experimento é realizado para avaliar os efeitos crônicos do álcool. Deste modo, os resultados obtidos pela aplicação do CS indicaram uma não genotoxicidade e mutagenicidade para o etanol, na concentração utilizada, caracterizando-se em importantes informações sobre a ação do etanol em sistema-teste de *A. cepa*. Com isso, podemos assegurar que os dados dos tratamentos refletem, somente, a ação dos componentes presentes nos extratos testados neste trabalho.

De acordo com os testes *in vivo* realizados por Tavares et al. (2006), o EEPV exibe efeito genotóxico quando em altas concentrações (100 µg/mL). Pereira et al. (2008), por meio do ensaio do cometa realizado com leucócitos de camundongos, também verificaram que o EEPV foi capaz de induzir danos ao DNA, quando utilizado em altas concentrações (1000 mg/kg de massa corporal).

Resende et al. (2007) avaliaram o efeito do EEBD em eritrócitos de ratos, onde os autores observaram que o extrato não aumentou a frequência de micronúcleos, ou seja, não induziu mutagenicidade. Esses dados são compatíveis com os resultados deste trabalho, obtidos para o sistema-teste de *A. cepa*, conforme acima apresentados.

Além dos extratos etanólicos da própolis e de extrato de alecrim-do-campo não induzirem efeitos prejudiciais às células de cebola, eles também foram capazes de bloquear, neste organismo teste, a ação mutagênica do MMS. Ambos os extratos parecem ter protegido as células contra as conhecidas propriedades clastogênicas do agente alquilante utilizado como controle positivo.

Alguns autores descrevem a própolis como um composto que pode reduzir os danos induzidos por diversas substâncias mutagênicas. Varanda et al. (1999) também demonstraram, pelo teste de Ames, realizado com *S. typhimurium* de diferentes linhagens (TA98, TA100 e TA102), uma atividade antimutagênica para extratos etanólicos de própolis, pela indução da ação mutagênica da daunomicina, do benzo[a]pireno e da aflatoxina. Jeng et al. (2000) aferiram, pelos resultados obtidos com o teste de Ames, que o extrato etanólico da própolis inibiu a mutagenicidade de quatro agentes mutagênicos, sendo dois deles de ação direta e dois de ação indireta. Em um trabalho mais recente, Fu et al. (2005), além de

reportarem o efeito antimutagênico de extrato de própolis contra a daunomicina e da aflatoxina em *S. typhimurium*, apontaram este mesmo efeito antimutagênico, quando testaram a ciclofosfamida e a mitomicina em ratos.

Moreno et al. (2005) também demonstraram que amostras de própolis foram capazes de inibir os efeitos mutagênicos da isoquinolina e da 4-nitrofenilenodiamina, em testes com *S. typhimurium*. Outro estudo também demonstrou que o extrato etanólico da própolis foi antigenotóxico/antimutagênico contra os efeitos da doxorubicina, em culturas de células do tipo CHO (TAVARES et al., 2006). Russo et al. (2006) divulgaram um estudo onde os autores comprovaram que a própolis protegeu espermatozóides humanos contra os danos ao seu DNA, induzidos pelo benzo[a]pireno e por espécies reativas de oxigênio.

Desta forma, os resultados aqui obtidos com *A. cepa*, reforçam a capacidade antimutagênica da própolis e aponta este organismo teste como um sistema-teste sensível e com potencialidade de ser usado em estudos de mutagenicidade.

Em contraste aos estudos utilizando-se própolis, existem poucos relatos sobre os efeitos do extrato de *Baccharis dracunculifolia*, talvez por ser recente a descoberta de sua relação como fonte botânica para produção da própolis do tipo verde, por abelhas do gênero *Apis* (PARK et al., 2002; KUMAZAWA et al., 2003; PARK et al., 2004; SALATINO et al., 2005). Este tipo de própolis é característica de uma região específica do Brasil, mais precisamente do sul do estado de Minas Gerais e norte do estado de São Paulo (ALENCAR et al., 2005). Nessas regiões as abelhas coletam folhas jovens, brotos e botões florais do alecrim-do-campo (*B. dracunculifolia*) (KUMAZAWA et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2005), planta comum na flora do cerrado local.

Park et al. (2005) demonstraram que, além de *B. dracunculifolia* ser a principal origem botânica da própolis verde brasileira, esta planta, na forma de extrato etanólico, pode prevenir a toxicidade da dioxina, que é um organoclorado altamente tóxico, carcinogênico e teratogênico. Estudos realizados por Resende et al. (2007) também evidenciaram a antimutagenicidade do extrato etil-acetato de *B. dracunculifolia*, pela intervenção contra os danos causados pela doxorubicina, o que levou a uma redução nos danos de cromossomos de ratos usados como sistema-teste.

Apesar dos diversos estudos publicados sobre os efeitos da exposição a estes extratos, os meios de atuação dos componentes da própolis verde e do alecrim-do-campo ainda não estão suficientemente esclarecidos.

Tavares et al. (2006) atribuíram ao extrato de própolis, a característica de atuar como um composto com efeito de “Janus”, ou seja, pode se comportar como agente genotóxico ou antígenotóxico, dependendo da condição experimental utilizada. Neste mesmo trabalho, quando aplicado em altas concentrações (100 µg/mL), o extrato foi genotóxico, mas quando usado em baixas concentrações (12.5 µg/mL), exerceu atividades quimiopreventivas. De acordo com Mersch-Sundermann et al. (2004 apud TAVARES et al., 2006), este mesmo fenômeno também ocorre com o extrato etanólico de *Toxicodendron quercifolium* (carvalho venenoso), o qual é vastamente utilizado em homeopatia. Estes autores revelam que este efeito pode ser observado também em flavonóides presentes no extrato vegetal deste carvalho, assim como em extratos de *B. dracunculifolia* e da própolis. Nossos dados, cujos ensaios foram realizados com baixas concentrações de extrato de própolis e de *B. dracunculifolia* corroboram a ação protetora destes compostos.

Os efeitos biológicos destes extratos devem-se ao grande conteúdo de compostos fenólicos, principalmente aos flavonóides presentes. Lima (2007) testou três substâncias encontradas na própolis verde e observou que elas aumentaram a mutagenicidade do MMS. No entanto, essas mesmas substâncias produziram atividade quimiopreventiva contra outros dois agentes mutagênicos.

Sabe-se que os flavonóides possuem grande potencial antioxidante, sendo esta a principal característica deles, embora alguns tenham efeitos pró-oxidantes e mutagênicos. Wattenberg (1985) foi um dos primeiros pesquisadores a sugerir que os flavonóides podem exercer efeitos antimutagênicos e anticarcinogênicos. Atualmente, Tavares et al. (2006) sugerem que os flavonóides são os principais componentes responsáveis pelos efeitos mutagênicos e antimutagênicos da própolis.

No extrato etanólico da própolis verde, utilizado no presente estudo, foi determinada a presença de ácido caféico, ácido ferúlico, rutina e quercetina, e no extrato etanólico do alecrim-do-campo foram encontrados estas mesmas substâncias, além do flavonóide canferol. Os ácidos caféico e ferúlico são ácidos fenólicos, enquanto que a rutina pertence ao grupo das flavonas derivadas

(geralmente descrita como um bioflavonóide) e a quercetina e o canferol são flavonóides da classe flavonol.

As diversas classes de flavonóides possuem um largo espectro de atividades biológicas e acredita-se que a atividade específica deles na função celular esteja relacionada à sua estrutura química (MIDDLETON; KANDASWAMI, 1993). De acordo com Horn; Vargas (2008), entre vários compostos fitoquímicos, os flavonóides e os taninos são compostos que apresentam atividades mutagênicas e antimutagênicas.

Como meio de evidenciar a importância da relação estrutura-atividade dos flavonóides, o trabalho de Agullo et al. (1996) apresenta resultados interessantes. Pela comparação de cinco famílias estruturalmente diferentes de flavonóides, foram identificadas, sobre células HT29, algumas características estruturais associadas com a atividade citotóxica dos flavonóides. Aparentemente, os flavonóides das classes flavonas e flavonóis são muito potentes e afetam a viabilidade celular, enquanto os pertencentes às classes catequina, flavanona e isoflavona permanecem inativos. Casagrande; Darbon, em 2001, sugeriram que, com exceção da daidzeína, as flavonas, os flavonóis e as isoflavonas são potentes compostos antiproliferativos, independentemente do número de grupos hidroxilas que apresentam, desde que o anel C seja conservado. Para Agullo et al. (1996), a ausência da insaturação entre C2 e C3 resulta na perda do potencial citotóxico. No entanto, para Casagrande; Darbon (2001), este potencial pode ser muito fraco ou até mesmo inativo, quando não há esta dupla ligação (flavanonas e flavononóis) e tal ausência é aliada à ausência da função oxo na posição 4 do anel C, como acontece nas catequinas,

Choi et al. (1994) demonstraram que um extrato metanólico de um vegetal, rico em flavonóides, exibiu efeitos antimutagênicos, confrontando com outros trabalhos que apontam os flavonóides como mutagênicos. No entanto, outros trabalhos mais recentes mostram que os flavonóides podem suprimir e/ou reduzir a mutagenicidade de vários compostos químicos (DEPEINT et al., 2002). Nossos resultados mostraram que o extrato etanólico de *B. dracunculifolia* apresenta, quando usado na concentração de 30%, uma ação antimutagênica, corroborando com os dados de outros autores acima apresentados, que associam aos extratos vegetais ricos em flavonóides uma atividade antimutagênica.

Steele et al. (1985) obtiveram resultados negativos para a mutagenicidade de catequinas em linhagens de bactérias. Sob as mesmas condições experimentais,

estes autores demonstraram que estes mesmos flavonóides também inibiram a ação mutagênica de aminas aromáticas, um enorme grupo de químicos carcinogênicos. Além disto, descreveram que o mecanismo de ação pode envolver a interação direta entre agente mutagênico e a catequina e/ou a inibição, pelos flavonóides, da geração de algum metabólito com ação carcinogênica.

Apesar dos diversos estudos realizados quanto ao potencial antimutagênico e/ou antígeno-tóxico de extratos vegetais, os mecanismos de antimutagenicidade ainda não estão completamente esclarecidos ou são, até mesmo, desconhecidos. Esta ação antimutagênica pode ser resultado da atividade antioxidante ou da interferência de um ou mais compostos ativos nas vias metabólicas, onde os agentes mutagênicos atuam (RESENDE et al., 2007). Knasmüller et al. (2002) ainda ressaltam que muitos compostos quimioprotetores agem, simultaneamente, em diferentes níveis de proteção.

## 5. Conclusão

Os extratos etanólicos de própolis verde e de *B. dracunculifolia* não induziram mutagenicidade e foram eficientes na proteção de células meristemáticas e da geração F<sub>1</sub> de *Allium cepa*, inibindo a clastogenicidade do Metilmetano Sulfonato. O organismo teste *A. cepa* se caracteriza em um sistema-teste sensível para testes de antimutagenicidade, e pode caracterizar em mais um sistema-teste usado para este tipo de avaliação. Pelo número escasso de publicações sobre os modos de ação de extratos etanólicos de própolis e das plantas que são as fontes de coleta para as abelhas, fica clara a necessidade de mais estudos com estes compostos químicos, para que se possa esclarecer melhor os mecanismos e modo de ação destes compostos sobre as células a eles expostas.

## 6. Referências

AGULLO, G.; GAMET, L.; BESSON, C.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and CaCo-2 cells. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 87, pp. 55-63, 1994.

AGULLO, G.; GAMET-PAYRASTRE, L.; FERNANDEZ, Y.; ANCIAUX, N.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 105, pp. 61-70, 1996.

ALENCAR, S.; AGUIAR, C.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y.K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, pp. 909-915, 2005.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, pp. 114-117, 2005a.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2, n. 1, pp. 29-31, 2005b.

BANKOVA, V.; CASTRO, S.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, Versailles, v. 30, pp. 3-15, 2000.

BANKSOTA, A.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.G.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 72, pp. 239-246, 2000.

BARNES, S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, pp. 777S-783S, 1995.

BEUDOT, C.; MÉO, M.; DAUZONNE, D.; ELIAS, R.; LAGET, M.; GUIRAUD, H.; BALANSARD, G.; DUMÉNIL, G. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of forty-two 3-substituted flavones in the Ames test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 417, pp. 141-153, 1998.

BURDOCK, G. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, pp. 347-363, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Art. 83, inciso IV do Regimento Interno da Secretaria, aprovado pela Portaria Ministerial nº. 574**, de 8 de Dezembro de 1998.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Oxford, v. 72, pp. 722-725, 2008.

CASAGRANDE, F.; DARBON, J. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 e CDK1. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 61, pp. 1205-1215, 2001.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Milão, v. 73, n. 1, pp. S1-S6, 2002.

CHOI, J.; PARK, K.; MOON, S.; RHEE, S.; YOUNG, H. Antimutagenic effect of plant flavonoids in the *Salmonella* Assay System. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 17, n. 2, pp. 71-75, 1994.

COSTA, A. **Farmacognosia**. Lisboa, Fundação Calouste Grilbenkian. 2ª Ed., v. 3, 1982.

CRANE, E. **Bees and Beekeeping: Science, Practice and World Recourses**. Londres, Heinemann, 1988.

DEPEINT, F.; GEE, J.; WILLIAMSON, G.; JOHNSON, I. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 61, pp. 97-103, 2002.

DESCHNER, E.; RUPERTO, J.; WONG, G.; NEWMARK, H. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 12, pp. 1193-1196, 1991.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 88, pp. 252-259, 2007.

FU, J.; XIA, Y.; ZHENG, Y. Antimutagenicity of propolis against some mutagens *in vivo* e *in vitro*. **Biomedical and Environmental Sciences**, Pequim, v. 17, pp. 469-475, 2005.

FUKUDA, M.; OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 54, n. 10, pp. 1465-1468, 2006.

FUNARI, C.; FERRO, V.; MATHOR, M. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 111, pp. 206-212, 2007.

GHISALBERTI, E. Propolis: a review. **Bee World**, Cardiff, v. 60, pp. 59-84, 1979.

HORN, R.; VARGAS, V. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the salmonella/microsome assay. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 22, pp. 1043-1049, 2008.

JENG, S.; SHIH, M.; KAO, C.; LIU, T.; CHEN, S. Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, pp. 893-897, 2000.

KNASMÜLLER, S.; STEINKELLNER, H.; MAJER, B.; NOBIS, E.; SCHARF, G.; KASSIE, F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, pp. 1051-1062, 2002.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 51, n. 6, pp. 740-742, 2003.

KUNT, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **European Journal of Nutrition**, [s.n.], v. 38, pp. 133-142, 1999.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 650, pp. 80-86, 2008b.

LEME, D.M.; de ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 88, pp. 214-219, 2008a.

LIMA, R. **Mecanismos de ação da própolis na modulação de danos quimicamente induzidos no DNA**. 2007. 67f. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Versailles, v. 26, pp. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 46, 1998.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential evaluation of the water of river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* system. **Cytologia**, Tóquio, v. 69, pp. 399-408, 2004.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.; DIAS, A.; FONSECA, I.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 1, 2006.

MATSUO, M.; SASAKI, N.; SAGA, K.; KANEKO, T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 28, n. 2, pp. 253-259, 2005.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, pp. 405-411, 2005.

MIDDLETON, E.Jr.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In: J. HARBORNE. **The Flavonoids: Advances in Research Since 1986**, Chapman and Hall, Londres, pp. 619-652, 1993.

MORENO, M.; ZAMPINI, I.; ORDÓÑEZ, R.; JAIME, G.; VATTUONE, M.; ISLA, A. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of propolis from Tucuman, Argentina. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, pp. 8957-8962, 2005.

NGUYEN, T.; TRAN, E.; ONG, C.; LEE, S.; DO, P.; HUYNH, T.; NGUYEN, T.; LEE, J.J.; TAN, Y.; ONG, C.S.; HUYNH, H. Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of MEK-MAPK. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 197, pp. 110-121, 2003.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.; AGUIAR, C. Botanical origin and chemical composition of brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, pp. 2502-2506, 2002.

PARK, Y.K.; FUKUDA, I.; ASHIDA, H.; NISHIUMI, S.; YOSHIDA, K.; DAUGSCH, A.; SATO, H.H.; PASTORE, G.M. Suppressive effects of ethanolic extrats of propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, pp. 10306-10309, 2005.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.; AGUIAR, C.; ALENCAR, S.; FUJIWARA, F. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 5, pp. 1100-1103, 2004.

PEDRO, J. **Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, do inseticida fipronil no organismo teste *Allium cepa***. 2008. 103f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

PEREIRA, A.; ANDRADE, S.; SWERTS, M.; MAISTRO, E. First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, pp. 2580-2584, 2008.

PEREIRA, A.; SEIXAS, F.; AQUINO-NETO, F. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, pp. 321-326, 2002.

PETERSON, G. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, pp. 748S-789S, 1995.

PHILLIPS, B.; JENKINSON, P. Is ethanol genotoxic? A review of the published data. **Mutagenesis**, Oxford, v. 16, n. 2, pp. 91-101, 2001.

RESENDE, F.; ALVES, J.; MUNARI, C.; SENEDESE, J.; SOUSA, J.; BASTOS, J.; TAVARES, D.C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 634, pp. 112-118, 2007.

ROBERTO, M. **Avaliação do potencial antimutagênico de extrato etanólico da própolis, por meio do sistema teste de *Allium cepa***. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil, 2006.

RUSSO, A.; TRONCOSO, N.; SANCHEZ, F.; GARBARINO, J.; VANELLA, A. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[a]pyrene and exogenous reactive oxygen species. **Life Sciences**, Elmsford, v. 78, pp. 1401-1406, 2006.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2, n. 1, pp. 33-38, 2005.

SIMÕES, L.; GREGÓRIO, L.; da SILVA FILHO, A.; de SOUZA, M.; AZZOLINI, A.; BASTOS, J.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, pp. 59-65, 2004.

STEELE, C.; LALIES, M.; IOANNIDES, C. Inhibition of the mutagenicity of aromatic amines by the plant flavonoid (+)-catechin. **Cancer Research**, Baltimore, v. 45, pp. 3573-3577, 1985.

TAVARES, D.; BARCELOS, G.; SILVA, L.; TONIN, C.; BASTOS, J. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 20, pp. 1154-1158, 2006.

TEIXEIRA, E.; NEGRI, G.; MEIRA, R.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of Green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Journal of Oxford University Press**, Oxford, v. 2, n. 1, pp. 85-92, 2005.

UTESCH, D.; FEIGE, K.; DASENBROCK, J.; BROSCARD, T.; HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; LINES, T.C. Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 654, pp. 38-44, 2008.

VARANDA, E.; MONTI, R.; TAVARES, D. Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct and indirect-acting mutagens. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, New York, v. 19, pp. 403-413, 1999.

VERDI, L.; BRIGHETE, I.; PIZZOLATTI, M. The *Baccharis* genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, pp. 85-94, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 2<sup>a</sup> Ed., 384f, 1984.

WATTENBERG, L. Chemoprevention of Cancer. **Cancer Research**, Baltimore, v. 45, pp. 1-8, 1985.

WOISKY, R.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, Londres, v. 37, n. 2, pp. 99-105, 1998.

**Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de extrato de própolis e de sua fonte botânica, por meio de testes com células HTC mantidas em cultura.**

Matheus Mantuanelli Roberto<sup>1</sup>, Sílvia Tamie Matsumoto<sup>2</sup>, Cláudia Masrouah Jamal<sup>3</sup>, Osmar Malaspina<sup>1</sup>, Maria Aparecida Marin-Morales<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, CP199, 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, 29055-070, Vitória, ES, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, 29040-090, Vitória, ES, Brasil.

## Resumo

Muitas substâncias, presentes no ambiente interagem com o material genético dos organismos vivos e podem promover danos na fita de DNA. O extrato etanólico da própolis é amplamente usado para fins terapêuticos, embora pouco se saiba sobre as suas características protetoras e seu modo de ação nas células. A própolis verde brasileira, oriunda de partes vegetais de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), tem sido muito comercializada e utilizada com propósitos medicinais. Este trabalho teve como objetivo avaliar a potencialidade genotóxica/mutagênica e antimutagênica do extrato etanólico da própolis verde (EEPV) e do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* (EEBD), sobre células HTC mantidas em cultura. Não foi observado, por meio do ensaio do cometa, qualquer efeito genotóxico para os extratos testados. Pela análise da indução de micronúcleo com bloqueio de citocinese de células HTC expostas aos extratos, foi observada uma ação não mutagênica para estes extratos. Quando as células foram submetidas ao tratamento simultâneo dos extratos com Metilmetano Sulfonato (MMS, agente reconhecidamente mutagênico), os danos provocados pelo MMS foram reduzidos consideravelmente. O tratamento com o EEPV e com o EEBD, sem incubação prévia, apresentou frequências significativas de MN nas células de HTC, ou seja, não demonstraram potencial antimutagênico. No entanto, quando estes extratos foram previamente incubados, houve redução significativa da frequência de MN. Pelos resultados obtidos, podemos inferir que os extratos incubados apresentam uma potencialidade maior de redução de danos no DNA, provocados pelo MMS (86,67% para o EEPV e 85,00% para o EEBD), do que os não incubados previamente. Assim, podemos sugerir que a ação dos extratos etanólicos testados neste trabalho é característica de agentes desmutagênicos, cuja propriedade é inativar as substâncias mutagênicas antes da sua atuação sobre o material genético dos organismos vivos.

**Palavras-chave:** Própolis verde, *Baccharis dracunculifolia*, teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese, agentes desmutagênicos.

## 1. Introdução

A própolis é uma substância resinosa elaborada pelas abelhas a partir de órgãos vegetais variados, como folhas, brotos, gemas e botões florais (MARCUCCI, 1995), de onde são extraídas secreções vegetais, geralmente, materiais lipofílicos de folhas e brotos de folhas, gomas, resinas, látex, etc. (CRANE, 1988). Neste material é acrescido saliva, rica em enzimas, que o digere parcialmente, além de cera de abelha. Esta mistura é, então, usada na construção da colméia.

As própolis possuem composições químicas altamente complexas e variáveis, as quais estão intimamente relacionadas com a flora de cada região visitada pelas abelhas, mas, em geral, é composta por resina e bálsamo vegetal, cera, essência e óleos aromáticos, pólen e várias outras substâncias, incluindo fragmentos orgânicos (BURDOCK, 1998).

Atualmente, foram identificados, aproximadamente, 300 componentes em amostras de própolis, sendo principalmente, formados por compostos fenólicos. A maioria destes compostos isolados pertence a três grandes grupos: flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres, cujas concentrações variam, dependendo da ecoflora da região de coleta (SIMÕES et al., 2004).

A própolis é considerada a mais importante arma química das abelhas contra microrganismos patogênicos. Pelas suas características antibióticas, ela também tem sido utilizada com o mesmo propósito pelos humanos (BANKOVA, 2005a; 2005b). Devido à sua extensa variabilidade de atividades biológicas, a própolis é utilizada em alimentos, bebidas e na medicina popular de alguns países. (BANKSOTA et al., 2000).

Segundo alguns autores (PEREIRA et al., 2002; SALATINO et al., 2005; MENEZES, 2005), a própolis possui diversas atividades biológicas e farmacológicas, que vão além da atividade antibiótica, como por exemplo, a atividade antioxidante. Dentre as atividades biológicas exercidas pela própolis, a atividade antimutagênica foi pouco estudada. Varanda et al. (1999), por meio do teste de Ames, observaram que a própolis promoveu uma redução significativa dos danos induzidos por substâncias de reconhecida atividade mutagênica, como a daunomicina, o benzo[a]pireno e a aflatoxina B1. De acordo com estes mesmos autores, a atividade antimutagênica da própolis está diretamente relacionada à sua atividade antioxidante.

Segundo Bankova et al. (2000), a composição química de própolis de regiões tropicais e de regiões temperadas são diferentes. Nas amostras de regiões temperadas, o perfil químico exhibe, em sua maioria, apenas flavonóides, enquanto nas amostras de regiões tropicais outros componentes são identificados, principalmente, diterpenos, compostos prenilatados, além de lignanas e outras classes de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos. Na composição da própolis de região tropical também são encontrados elementos inorgânicos, como o Cu, Mn, Fe, Ca, Al, Si e V (MARCUCCI, 1996). A composição química da própolis também pode variar devido a fatores genéticos das abelhas que a produz (PARK et al., 1998).

Após comprovação da alta relação da variabilidade química da própolis com a fonte vegetal de coleta das abelhas, diversos pesquisadores têm investigado a principal origem botânica de cada uma das diferentes amostras de própolis. Park et al. (2000), por exemplo, classificou as própolis brasileiras em 12 tipos diferentes, de acordo com seu perfil químico e a região de coleta das abelhas.

A própolis verde, produzida pelas abelhas da região sul do estado de Minas Gerais e norte do estado de São Paulo, foi identificada como o tipo 12 (PARK et al., 2000). Esta própolis tem como fonte o exudato de folhas da espécie *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), popularmente, conhecida como alecrim-do-campo (KUMAZAWA et al., 2003; PARK et al., 2004; ALENCAR et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005).

Neste trabalho procurou-se avaliar o potencial genotóxico/mutagênico e antigenotóxico/antimutagênico do extrato etanólico da própolis verde e do extrato etanólico de *B. dracunculifolia*. Para a avaliação destas atividades, foram desenvolvidos o teste do micronúcleo, com bloqueio da citocinese, e o ensaio do cometa, em células de mamíferos (HTC) mantidas em cultura.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Origem da própolis e sua fonte botânica**

As amostras de própolis verde e de *B. dracunculifolia* foram obtidas junto à coleção de própolis do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Rio Claro. As amostras de própolis e de *B. dracunculifolia* foram coletadas na cidade de Carvalhópolis, sul do estado de Minas

Gerais, Brasil, gentilmente cedidas pelo Apiário Floresta Comércio Importação e Exportação Ltda.

## **2.2. Preparação do extrato etanólico da própolis (EEPV)**

Para a preparação do EEPV, foi macerada uma amostra de 30g da própolis bruta, adicionando posteriormente etanol 70%, até completar o volume de 100 mL. Pela densidade do extrato obtido, comparado com a densidade do etanol, obteve-se um extrato de concentração de 31,4% de própolis.

A mistura própolis/álcool obtida foi colocada em um balão de fundo chato, para o procedimento de extração a quente sob refluxo simples, por um período de 6 horas. Após este tempo, o extrato obtido foi filtrado, a quente, resfriado e colocado em uma proveta de 100 mL, para decantar a cera em suspensão. O extrato foi novamente filtrado para a retirada da cera, sendo o volume novamente completado para 100 mL com álcool 70%, para correção do volume de álcool evaporado durante o processo de extração.

O etanol foi escolhido como solvente para a obtenção do extrato, pois, de acordo com Burdock (1998), o extrato etanólico da própolis é a forma mais comumente consumida e comercializada para uso humano.

## **2.3. Preparação do extrato etanólico de Baccharis dracunculifolia (EEBD)**

Para a preparação do EEBD, foi realizado processo semelhante ao usado para o EEPV, substituindo neste caso, os 30 g de própolis por 30 g de folhas jovens e gemas da planta *B. dracunculifolia*. Por meio dos mesmos cálculos de densidade, a concentração obtida para o EEBD foi de 33,8%.

O procedimento seguiu semelhantemente à preparação do EEPV, porém não houve a necessidade do período de decantação, por não haver a presença de cera no extrato vegetal.

## **2.4. Caracterização fitoquímica dos extratos etanólicos**

Os extratos etanólicos de própolis verde e do alecrim-do-campo foram analisados quimicamente para obtenção da sua constituição natural, quanto às substâncias cumarinas, alcalóides, saponinas, esteróides e triterpenóides (COSTA, 1982).

### **2.5. Determinação da quantidade total de flavonóides dos extratos etanólicos**

Após a extração, foram quantificados os flavonóides totais dos extratos etanólicos obtidos (EEPV e EEBD). A determinação da quantidade de flavonóides totais foi obtida pelo padrão de quercetina, de acordo com a metodologia descrita por Woisky (1996 apud MARCUCCI et al. 1998) e Woisky; Salatino, (1998), com pequenas modificações. Para esta determinação, foram colocados, em um tubo de ensaio, 5,0 mL de etanol absoluto e 5 µL de cada amostra, separadamente, e em seguida, 100 µL do reagente  $\text{AlCl}_3$  na concentração de 2% em metanol.

Após agitação por 5 segundos e um repouso isento de luz por 30 minutos (para que não houvesse degradação da amostra), as amostras foram lidas em espectrofotômetro em  $\lambda = 425 \text{ nm}$ .

### **2.6. Cromatografia em camada delgada (CCD)**

Para obter os perfis cromatográficos, por CCD, e determinar os tipos de terpenos, compostos fenólicos simples e flavonóides presentes nos extratos etanólicos de própolis verde e do alecrim-do-campo, foram utilizados reveladores específicos para cada classe de compostos (WAGNER et al., 1984).

### **2.7. Determinação de sólidos solúveis totais**

Os sólidos solúveis totais do EEPV e do EEBD foram determinados por meio de análise em um refratômetro de Abbe.

### **2.8. Cultura de células de mamíferos (HTC)**

A linhagem celular de hepatoma de rato (HTC) foi cultivada em 5 mL de meio de cultura D-MEM/F-12, suplementado com 10% de soro bovino fetal, em frascos de  $25 \text{ cm}^2$  com uma concentração inicial de  $1 \times 10^6$  células por frasco, mantidas em estufa a  $37^\circ \text{C}$  por um período de 24 horas.

As células do controle negativo (CN) receberam 50 µL de tampão fosfato – PBS e permaneceram na estufa por mais um período de 24 horas. Para o controle positivo (CP), foram utilizados 50 µL de MMS na concentração de  $4 \times 10^{-2} \text{ M}$ , em dois períodos (3 e 24 horas), processados em frascos diferentes. Foi realizado, concomitante aos demais testes, um teste com o etanol (controle do solvente – CS),

para comprovar a não mutagenicidade do etanol, conforme já descrito por Obe; Ristow (1979 apud PHILLIPS; JENKINSON, 2001) para células de mamíferos.

Para o teste de mutagenicidade foram adicionados, por mais 24 horas, 50 µL dos extratos etanólicos (própolis verde e alecrim-do-campo a 0,06 µL/mL).

Para o teste de antimutagenicidade, foram desenvolvidos ensaios submetendo as células em meios de culturas que receberam uma mistura de extratos etanólicos e MMS (tratamento simultâneo). Os ensaios foram realizados separadamente para cada um dos extratos testados, associados ao MMS, sempre na proporção de 1:1. As misturas foram testadas de duas formas: 1. sem incubação prévia, onde o extrato foi misturado ao MMS no momento da sua adição ao meio de cultura; 2. com pré-incubação, onde a mistura foi realizada, anteriormente à sua adição ao meio, sendo mantida em estufa a 37°C por 1 hora, e só posteriormente acrescentada ao meio de cultura. Todos os tratamentos foram realizados por um período de 3 horas de exposição e sempre em triplicata.

Os extratos foram utilizados na concentração de 0,06 µL/mL, diluídos em água pura e filtrados em membrana com poros de 20 µm de diâmetro, para eliminar microrganismos que pudessem contaminar o material.

### ***2.9. Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese (TMNBC)***

Após a exposição das células aos diversos tratamentos propostos, o meio de cultura foi descartado e as células lavadas duas vezes com 5 mL de PBS. Após este processo foram adicionados 5 mL de meio com soro, juntamente com 50 µL de citocalasina B (300 µg/mL - Sigma). Os frascos foram deixados na estufa por 30 horas, para que ocorresse mais um ciclo de divisão celular.

Para a colheita das células, o conteúdo dos frascos (meio + soro) foi transferido para tubos de centrifuga e reservado. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e soltas da parede do frasco, utilizando-se 500 µL de Tripsina–EDTA (0,025%). A tripsina foi neutralizada com a adição do meio de cultura anteriormente reservado nos tubos de centrifuga. O conteúdo dos frascos foi homogeneizado e colocado nos tubos de centrifuga, juntamente com uma gota de formaldeído 40%. A suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos a 1.000 rpm e o sobrenadante resultante descartado, reservando-se, apenas, 1,5 mL ao qual foi adicionado 1,5 mL de solução hipotônica de citrato de sódio (1%). O pellet foi novamente ressuspendido e centrifugado sob as mesmas condições anteriormente

descritas. O sobrenadante foi descartado e 5 mL de metanol-ácido acético (3:1) foram adicionados para fixar as células. O pellet foi ressuspensionado, centrifugado e o sobrenadante descartado. O novo pellet foi ressuspensionado com 5 mL de fixador recém preparado e guardado para confecção das lâminas.

As lâminas utilizadas no experimento foram lavadas com detergente neutro Extran® e guardadas na geladeira (4°C), imersas em água de osmose reversa, até a sua utilização.

Para a confecção das lâminas, o material armazenado foi centrifugado por 5 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o material ressuspensionado com algumas gotas de fixador recém preparado. A suspensão foi gotejada sobre lâminas geladas (contendo um fino filme d'água). Estas foram inclinadas para escorrer o material gotejado e deixadas para secar. Posteriormente, foram coradas com Giemsa 5%, por 5 minutos, e analisadas.

Foram confeccionadas 6 lâminas para cada tratamento e analisadas 1.000 células, totalizando 6.000 células por tratamento. A análise seguiu os critérios utilizados por Oliveira et al. (2007), onde são selecionadas células binucleadas com delimitações nucleares e citoplasmáticas intactas e não sobrepostas, além de considerar o tamanho, o padrão e a intensidade de coloração dos núcleos. O MN presente deve ter padrão de coloração semelhante ao do núcleo principal, não apresentar refringência e ter um tamanho entre 1/16 a 1/3 do núcleo da célula.

A análise dos resultados foi feita pelo teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

### **2.10. Ensaio do cometa**

Após o período de tratamento das células, o meio de cultura foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS e, pela adição de 500 µL de tripsina – EDTA 0,025%, soltaram-se da parede do frasco. Decorrido o período necessário para soltar as células, a tripsina foi neutralizada com a adição de meio de cultura novo com 10% de soro bovino fetal. O conteúdo foi homogeneizado e centrifugado por 5 minutos a 1.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, deixando-se apenas 0,5 mL para fazer a ressuspensão do material.

Para o teste de viabilidade celular foi preparada uma mistura de 20 µL de suspensão celular e 20 µL de corante azul de tripano, que foi utilizada para análise em microscopia de luz, utilizando-se câmara de Neubauer. Para a determinação da

citotoxicidade, pelo método da coloração exclusiva com azul de tripano, foi quantificada a proporção de células vivas (não coradas) e mortas (coradas em azul), aceitando-se o limite mínimo de 80% de células viáveis, para o prosseguimento do experimento.

Para a montagem das lâminas foi seguido o protocolo descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações. As lâminas, previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), foram montadas com 20 µL de suspensão celular, misturados a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). Estas foram cobertas com lamínulas e levadas à geladeira (4°C) por 20 minutos. Decorrido este tempo, as lamínulas foram retiradas e as lâminas mantidas em cubetas (protegidas da luz) contendo solução de lise (1 mL de triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: 2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris, ~ 8,0 g de NaOH sólido) gelada, mantidas em geladeira, por 1 hora.

Após a lise, as lâminas foram dispostas em uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (300 mM de NaOH, 1 mM de EDTA, pH>13) gelada e recém-preparada, por 20 minutos, para desnaturação do DNA. Após esse período, foi iniciada a corrida de eletroforese em corrente de 1,0 V/cm e 300 mA, por 20 minutos. As lâminas foram, então, neutralizadas com 5 mL de solução tampão neutralizadora (0,4 M de Tris-HCl, pH 7,5), em 3 séries de 5 minutos cada, secas na horizontal e fixadas com etanol 100%, por 10 minutos. As lâminas foram deixadas à temperatura ambiente para secar e estocadas em geladeira para posterior análise.

As lâminas foram coradas com solução de brometo de etídio a 0,002 mg/mL, preparada a partir de uma solução estoque (200 µg/mL), cobertas com lamínula e analisadas imediatamente à sua coloração.

Foram analisados 100 nucleóides por amostra, pela microscopia de fluorescência com filtro de excitação de 510-560 nm e filtro de barreira de 590 nm, em aumento de 400 vezes. Os nucleóides foram analisados e classificados visualmente, de acordo com a migração dos fragmentos de DNA, segundo Rigonato et al. (2005). Os cometas foram classificados em 4 classes: classe 0 (sem dano), classe 1 (pouco dano), classe 2 (médio dano) e classe 3 (muito dano) (Figura 1). Células com o núcleo completamente fragmentado, ou seja, em processo de morte celular, não foram contabilizados.

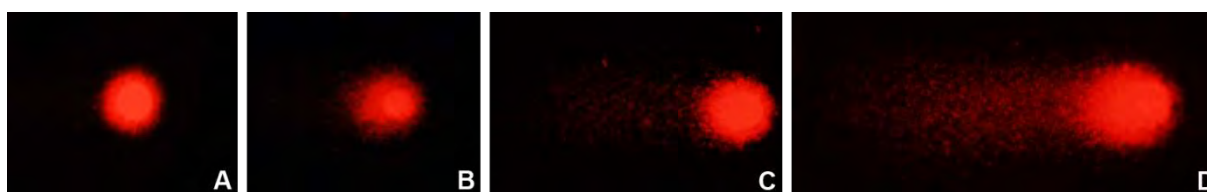


**Figura 1:** Exemplos das classes dos cometas, identificados de acordo com Rigonato et al. (2005). A: classe 0; B: classe 1; C: classe 2 e D: classe 3.

O escore de cada tratamento foi verificado multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe de dano pelo valor da classe (0, 1, 2 ou 3) e submetidos ao teste estatístico *t*-Student ( $p < 5\%$ ), para a comparação de danos entre os tratamentos e o controle negativo.

### **2.11. Determinação do efeito antimutagênico**

A atividade antimutagênica foi avaliada pela análise da porcentagem de redução de danos para cada um dos tratamentos com os extratos etanólicos da própolis verde e do alecrim-do-campo. Para determinar esta porcentagem, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Redução (\%)} = \frac{a - b}{a - c} \times 100$$

Onde: a = número de células micronucleadas ou com quebra cromossômica presentes no CP;  
b = Número de células micronucleadas ou com quebra cromossômica presentes nos tratamentos;  
c = número de células micronucleadas ou com quebra cromossômica presentes no CN.

## **3. Resultados**

### **3.1. Determinação da quantidade total de flavonóides dos extratos etanólicos**

Para o extrato etanólico da própolis verde, a quantidade de flavonóides medida através do padrão de quercetina foi de 3,65% (m/m). Para o extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* a quantidade foi de 0,67% (m/m), utilizando-se a mesma metodologia.

### **3.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)**

Os compostos fenólicos simples, flavonóides e triterpenos foram as classes químicas dos metabólitos secundários mais freqüentemente encontradas nos dois extratos avaliados.

Pelas análises de CCD, utilizando padrões para auxiliar nas identificações através da comparação do R<sub>f</sub> (fator de retenção) das amostras x padrões, foi possível identificar os seguintes compostos:

- Extrato de *B. dracunculifolia*: ácido ferúlico, ácido caféico, canferol, rutina e quercetina.
- Extrato de própolis verde: ácido ferúlico, ácido caféico, rutina e quercetina.

Neste trabalho só foram qualificados os flavonóides, uma vez que a quantificação específica dos mesmos requer outros métodos analíticos não aqui empregados.

### **3.3. Determinação dos sólidos solúveis totais**

Os sólidos solúveis totais, presentes no extrato etanólico da própolis foi equivalente a 35°Bx, enquanto para o extrato etanólico do alecrim-do-campo foi igual a 25°Bx. Estes valores de sólidos solúveis totais estão de acordo com o Regulamento de Identidade e Qualidade de Extrato de Própolis, do Ministério da Agricultura e Abastecimento, o qual estipula um mínimo de 11% de extrato seco (11°Bx) (BRASIL, 1998).

### **3.4. Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese (TMNBC)**

Após os tratamentos realizados com os extratos etanólicos da própolis verde (EPPV) e de *B. dracunculifolia* (EEBD), foram contabilizadas as células HTC binucleadas. Os resultados de freqüência, variação, média e desvio padrão de micronúcleos, assim como a porcentagem de redução de danos ao DNA, relativos ao TMNBC em células HTC, estão apresentados na tabela 1.

A análise estatística dos resultados mostrou que os extratos etanólicos estudados não induziram a formação de MN, portanto não apresentaram atividades mutagênicas.

Os resultados relativos à antimutagenicidade indicaram que os extratos etanólicos da própolis verde e do alecrim-do-campo só possuem atividade protetora,

após passarem por um período de incubação, realizado simultaneamente com o agente mutagênico. A porcentagem de redução de micronúcleos, do tratamento simultâneo após período de incubação, foi de 86,67% para o EEPV e 85,00% para o EEBD.

As freqüências de MN foram significativamente positivas para as células expostas à solução MMS + extrato, sem o período de incubação. Entretanto, após aplicação dos resultados na fórmula de verificação de redução de danos ao DNA, observou-se uma redução de 51,67% para o EEPV e 61,67% para o EEBD.

Todos os tratamentos de antimutagenicidade resultaram em uma redução dos danos causados pelos MMS, mas, aparentemente, o tratamento com uma pré-incubação exibe melhores resultados.

**Tabela 1:** Freqüência, variação, média, desvio padrão e porcentagem de redução de danos ao DNA, observadas pela aplicação do teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese em células HTC.

| Tratamento         |             | Freqüência de MN e DP (%) | Variação <sup>a</sup> | Média e DP | Redução (%) |
|--------------------|-------------|---------------------------|-----------------------|------------|-------------|
| Mutagenicidade     | CN          | 0.28±0.08                 | 2-4                   | 2.83±0.75  | -           |
|                    | CP          | 1.65±0.36*                | 12-21                 | 16.50±3.62 | -           |
|                    | CS          | 0.33±0.12                 | 2-5                   | 3.50±1.22  | -           |
|                    | EEPV        | 0.28±0.10                 | 1-4                   | 2.83±1.47  | -           |
|                    | EEBD        | 0.32±0.12                 | 2-5                   | 3.17±1.17  | -           |
| Antimutagenicidade | CN          | 0.25±0.24                 | 0-5                   | 2.50±2.43  | -           |
|                    | CP          | 1.25±0.23*                | 10-17                 | 12.50±2.35 | -           |
|                    | EEPV        | 0.73±0.12*                | 6-9                   | 7.33±1.21  | 51.67%      |
|                    | EEPV (Inc.) | 0.38±0.13                 | 3-6                   | 3.83±1.33  | 86.67%      |
|                    | EEBD        | 0.63±0.10*                | 5-8                   | 6.33±1.03  | 61.67%      |
|                    | EEBD (Inc.) | 0.40±0.14                 | 2-5                   | 4.00±1.41  | 85.00%      |

MN: Micronúcleo; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo com o MMS; CS: Controle do Solvente (etanol); EEPV: Extrato Etanólico da Própolis Verde; EEBD: Extrato Etanólico de *Baccharis dracunculifolia*; Inc.: Incubado; DP: Desvio Padrão.

<sup>a</sup> número máximo e mínimo de MN por 6000 células.

\* diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney –  $p < 0.05$ ).

### 3.5. Ensaio do cometa

Pelo teste de viabilidade das células coletadas, realizado pela coloração com azul de tripano, foi observada porcentagem de células viáveis, ou seja, não coradas, superiores a 98%, conforme mostra a tabela 2. Estes resultados demonstram que as

células apresentam uma viabilidade indicada para a realização do ensaio do cometa (mínimo de 80% de viabilidade celular).

No entanto, apesar da boa porcentagem de células viáveis, ocorreram problemas com a técnica do ensaio do cometa, durante a corrida de eletroforese, para verificar o potencial antigenotóxico dos extratos etanólicos. Deste modo, serão apresentados, apenas, os resultados relativos ao potencial genotóxico destes extratos.

Baseado nos resultados obtidos e apresentados na tabela 2, observa-se que o CS, assim como os extratos etanólicos da própolis e do alecrim-do-campo, não induziram danos genotóxicos. Apenas foram registrados efeitos significativos de clastogenicidade para o MMS ( $p < 0,05$  - Teste  $t$ -Student).

**Tabela 2:** Viabilidade celular, distribuição ao longo das diferentes classes de danos e escores do ensaio do cometa em células HTC.

|          | Tratamento  | Viabilidade celular (%) | Classe de Danos |             |             |           | Escores       |
|----------|-------------|-------------------------|-----------------|-------------|-------------|-----------|---------------|
|          |             |                         | 0               | 1           | 2           | 3         |               |
| 24 horas | CN          | 99.32±0.07              | 80.00±1.00      | 18.33±0.58  | 1.67±0.58   | 0.00±0.00 | 21.67±1.53    |
|          | CP          | 99.56±0.17              | 2.00±2.00       | 68.00±12.12 | 28.33±10.21 | 1.67±1.53 | 129.67±12.50* |
|          | CS          | 98.77±0.29              | 83.00±7.21      | 15.33±5.51  | 1.33±2.31   | 0.33±0.58 | 19.00±10.00   |
|          | EEPV        | 98.27±0.34              | 74.67±4.51      | 23.33±4.51  | 2.00±0.00   | 0.00±0.00 | 27.33±4.51    |
|          | EEBD        | 99.00±0.36              | 75.33±8.14      | 23.67±6.43  | 1.00±1.73   | 0.00±0.00 | 25.67±9.87    |
| 3 horas  | CN          | 98.33±0.74              | -               | -           | -           | -         | -             |
|          | CP          | 98.29±1.17              | -               | -           | -           | -         | -             |
|          | EEPV        | 98.14±0.95              | -               | -           | -           | -         | -             |
|          | EEPV (Inc.) | 98.96±0.04              | -               | -           | -           | -         | -             |
|          | EEBD        | 98.19±0.04              | -               | -           | -           | -         | -             |
|          | EEBD (Inc.) | 98.96±0.69              | -               | -           | -           | -         | -             |

CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo com o MMS; CS: Controle do Solvente (etanol); EEPV: Extrato Etanólico da Própolis Verde; EEBD: Extrato Etanólico de *Baccharis dracunculifolia*; Inc.: Incubado.

\* significativo para o teste  $t$ -Student ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

Neste trabalho foi verificado o potencial genotóxico, mutagênico e antimutagênico dos extratos etanólicos da própolis verde e da planta *B. dracunculifolia*, por meio do teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese e do ensaio do cometa em células de hepatoma de rato (HTC).

O tratamento realizado pela exposição das células HTC aos extratos etanólicos foi importante para verificar a possível mutagenicidade e genotoxicidade dos componentes dos extratos. Os resultados obtidos demonstram que nenhum dos extratos induziu a formação de micronúcleos nas células HTC, nem induziu a fragmentação do DNA, portanto, indicando que os mesmos não foram nem mutagênicos nem genotóxicos. Estes resultados estão em concordância com os dados obtidos por Tavares et al. (2006), os quais indicam que o extrato etanólico da própolis só foi capaz de induzir mutagenicidade em células CHO, quando aplicado em concentrações muito altas, concentrações estas superiores às testadas neste trabalho. Assim, os resultados também corroboram as conclusões de Resende et al. (2007), que demonstraram a inabilidade do extrato de alecrim-do-campo induzir frequências significativas de micronúcleos em eritrócitos de ratos.

Os resultados obtidos em relação à frequência de micronúcleos em células binucleadas, após o tratamento simultâneo com incubação, demonstram que o EEPV e o EEBD exibiram atividade antimutagênica para as células HTC.

De acordo com Kada; Shimo (1987), uma substância que consegue prevenir ou reduzir a mutagenicidade de um agente mutagênico poder ser chamado de agente antimutagênico. No entanto, o modo de ação preventivo desta substância pode ocorrer de duas maneiras: pela inativação do mutágeno, antes do seu ataque ao DNA, ou pela inibição da fixação de uma mutação no DNA de um organismo. Desta forma, estes autores sugerem as denominações agentes “desmutagênicos” (inativam a substância) e “bio-antimutagênicos” (inibem a fixação da mutação).

Baseando-se nestas definições e nos resultados aqui obtidos pelo teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese, sugerimos que a ação dos extratos da própolis verde e do alecrim-do-campo seja mais por ação desmutagênica do que bio-antimutagênica. Isto se deve aos melhores resultados obtidos pelos tratamentos realizados com pré-incubação. Desta maneira, os extratos foram capazes de inativar grande parte da potencialidade clastogênica do MMS e reduzir a taxa de indução de micronúcleos nas células HTC.

Contudo, foi observado que mesmo sem o período de incubação, os extratos também promoveram uma redução na frequência de micronúcleos, embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos. Frente a este resultado, podemos inferir que o tempo de exposição utilizado neste trabalho pode ser o responsável pela menor eficiência da ação, já que no tratamento simultâneo simples

o MMS ficou em contato com os extratos por 3 horas, e no tratamento com incubação, este contato foi prolongado para 4 horas.

Varanda et al. (1999) observaram, pelo sistema-teste de *Salmonella typhimurium*, uma atividade antimutagênica para extratos etanólicos de própolis. O extrato etanólico de própolis também foi estudado por Jeng et al. (2000), onde os autores mostraram que foi capaz de inibir a mutagenicidade de quatro agentes mutagênicos, sendo dois de ação direta e dois de ação indireta, verificado pelo teste de Ames, realizado com *S. typhimurium*, na presença da mistura metabolizadora S9. Além disso, este estudo mostrou que o extrato etanólico da própolis usada não foi citotóxico e nem mutagênico para as linhagens TA98 e TA100 desta mesma espécie procarionte. Resende et al. (2007) comprovaram a eficiência do extrato etanólico de *B. dracunculifolia* na redução da taxa de micronúcleos em ratos e relacionou o efeito antimutagênico à presença de compostos fenólicos no referido extrato.

No entanto, no trabalho de Bazo (2002), realizado pelo ensaio do cometa em células sangüíneas de ratos, a própolis aplicada em pré-tratamento e tratamento simultâneo não levou a qualquer redução nos danos promovidos pela dimetilhidrazina. Mas, neste mesmo trabalho, o autor observou, pelos ensaios de criptas aberrantes, que o pós-tratamento com a própolis foi mais eficiente, comprovado pela redução significativa do número de criptas no cólon distal dos ratos.

Sabe-se que a própolis é rica em compostos fenólicos, decorrente da presença destes compostos na planta relacionada com a sua produção. Dentre os compostos fenólicos mais comumente registrados para a própolis, estão os flavonóides (PARK et al., 2002). Por isso, diversos autores tentam relacionar a atividade biológica da própolis com o conteúdo fenólico que apresentam. Rao et al. (1992), após verificar que algumas propriedades biológicas da própolis estavam relacionadas com a presença de ésteres de ácido caféico, resolveram investigar a antimutagenicidade destas substâncias. Os autores observaram que não houve efeito mutagênico e que a ação de um agente mutagênico foi reduzida, quando exposto concomitantemente aos ésteres. Segundo Christov et al. (2006), o ácido caféico é um antioxidante muito conhecido, tanto que é utilizado como controle positivo em metodologias que avaliam a atividade aceptora de radicais livres. Além disso, estes mesmos autores verificaram a atividade antioxidante de amostras de própolis e relacionaram tal atividade com a presença de compostos fenólicos, assim

como outros ácidos aromáticos, como, por exemplo, o ferúlico. Nas amostras utilizadas neste trabalho foi identificada a presença de ácido caféico, de ácido ferúlico e de mais três flavonóides, o que já indica a possível ação antioxidante para a própolis verde.

Choi et al. (1994) verificaram as propriedades dos flavonóides e concluíram que pode haver diferença de atividade dentre as diferentes classes dos flavonóides, mas, em geral, eles foram eficazes na redução a mutagenicidade da aflatoxina B1. Beudot et al. (1998) também demonstraram o efeito mutagênico e antimutagênico de diversos flavonóides, contra diferentes agentes mutagênicos.

Diversos autores relacionam o poder antimutagênico de extratos de própolis com o potencial antioxidante deles. Park et al. (2005) demonstraram os efeitos antioxidantes de extratos etanólicos de própolis e de folha de *B. dracunculifolia*. Os autores concluíram que a própolis possui uma atividade anti radicais livres um pouco maior que a do extrato da planta, e que esta diferença pode ser resultado da diferença do conteúdo de compostos fenólicos presentes entre os extratos etanólicos.

Os flavonóides foram relatados por Scheller et al. (1990) como as substâncias antioxidantes mais abundante e mais efetivamente presentes em extratos etanólicos de própolis. Como as composições químicas dos EEPV e EEBD são semelhantes, conforme encontrado nas nossas análises químicas e também por outros autores (PARK et al., 2002; KUMAZAWA et al., 2003), acredita-se que o EEBD seja capaz de promover efeito antioxidante semelhante ao da própolis, ou seja, os efeitos antimutagênicos dos extratos podem estar relacionados com a propriedade aceptora de radicais livres.

Flora (1998) sugere que a atividade antimutagênica dos flavonóides seja decorrente, principalmente, da habilidade aceptora de radicais livres, sendo este um dos mais importantes mecanismos de antimutagênese e anticarcinogênese. Outros autores, como Russo et al. (2006), demonstraram que a atividade antimutagênica da própolis e o seu efeito protetor do DNA é devido, pelo menos em parte, pela característica antioxidante de seus principais componentes.

Banksota et al. (2000), demonstraram que o extrato aquoso de própolis brasileira foi capaz de exercer uma atividade antioxidante bastante expressiva, e relacionam este efeito com a presença de flavonóides e derivados de ácidos cinâmicos. Neste contexto, Moreno et al. (2005) também indicaram a própolis

argentina como antioxidante e mostraram que a correlação entre o conteúdo de flavonóides e a atividade antioxidante é significativa, mas ressaltaram que outros fatores, ainda desconhecidos, também podem estar envolvidos nessa propriedade.

## 5. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram a ausência de genotoxicidade e mutagenicidade de extratos etanólicos da própolis verde e de *B. dracunculifolia*, além de um efeito protetor destes extratos contra os efeitos de um agente comprovadamente mutagênico (MMS) em células de mamíferos. O MMS é um agente mutagênico alquilante de ação direta e, provavelmente, promove danos ao DNA pela inserção de grupos metila nas bases nitrogenadas, ou seja, pela metilação do DNA. Desta forma, como são aceptores de radicais livres, os flavonóides presentes nos extratos testados foram capazes de reagir com o MMS e capturar os radicais que danificariam o DNA. Este processo pode ter acontecido com mais eficiência durante o período de incubação dos extratos, o que indica que o período do tratamento simultâneo simples não parece ter sido suficiente para promover uma maior varredura dos radicais metil presentes na fita de DNA.

## 6. Referências

- ALENCAR, S.; AGUIAR, C.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y.K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, pp. 909-915, 2005.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, pp. 114-117, 2005a.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2, n. 1, pp. 29-31, 2005b.
- BANKOVA, V.; CASTRO, S.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, Versailles, v. 30, pp. 3-15, 2000.
- BANKSOTA, A.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.G.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 72, pp. 239-246, 2000.

BAZO, A. The antimutagenic and anticarcinogenic effect of propolis in Wistar rats. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 1, p. 113, 2002.

BEUDOT, C.; MÉO, M.; DAUZONNE, D.; ELIAS, R.; LAGET, M.; GUIRAUD, H.; BALANSARD, G.; DUMÉNIL, G. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of forty-two 3-substituted flavones in the Ames test. **Mutation Research**, Amsterdam, 417, pp. 141-153, 1998.

BURDOCK, G. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, pp. 347-363, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Art. 83, inciso IV do Regimento Interno da Secretaria, aprovado pela Portaria Ministerial nº. 574**, de 8 de Dezembro de 1998.

CHOI, J.; PARK, K.; MOON, S.; RHEE, S.; YOUNG, H. Antimutagenic effect of plant flavonoids in the Salmonella Assay System. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 17, n. 2, pp. 71-75, 1994.

CHRISTOV, R.; TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; BERTRAND, M. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 20, n. 6, pp. 531-536, 2006.

COSTA, A. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Grilbenkian, 2ª Ed., v. 3, 1982.

CRANE, E. **Bees and Beekeeping: Science, Practice and World Recourses**. Londres: Heinemann, 1988.

FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 402, pp. 151-158, 1998.

JENG, S.; SHIH, M.; KAO, C.; LIU, T.; CHEN, S. Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, pp. 893-897, 2000.

KADA, T.; SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens - Their modes of action. **BioEssays**, Cambridge, v. 7, n. 3, pp. 113-116, 1987.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 51, n. 6, pp. 740-742, 2003.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Versailles, n. 26, pp. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 5, pp. 529-536, 1996.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 46, 1998.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, pp. 405-411, 2005.

MORENO, M.; ZAMPINI, I.; ORDÓÑEZ, R.; JAIME, G.; VATTUONE, M.; ISLA, A. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of propolis from Tucuman, Argentina. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, pp. 8957-8962, 2005.

OLIVEIRA, R.; MATUO, R.; SILVA, A.; MATIAZI, H.; MANTOVANI, M.; RIBEIRO, L. Protective effect of B-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 21, pp. 41-52, 2007.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.; AGUIAR, C. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, pp. 2502-2506, 2002.

PARK, Y.K.; FUKUDA, I.; ASHIDA, H.; NISHIUMI, S.; YOSHIDA, K.; DAUGSCH, A.; SATO, H.; PASTORE, G. Suppressive effects of ethanolic extracts of propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, pp. 10306-10309, 2005.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 58, pp. 2-7, 2000.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.; ALCICI, N. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, pp. 313-318, 1998.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.; AGUIAR, C.; ALENCAR, S.; FUJIWARA, F. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 5, pp. 1100-1103, 2004.

PEREIRA, A.; SEIXAS, F.; AQUINO-NETO, F. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, pp. 321-326, 2002.

PHILLIPS, B.; JENKINSON, P. Is ethanol genotoxic? A review of the published data. **Mutagenesis**, Oxford, v. 16, n. 2, pp. 91-101, 2001.

RAO, C.; DESAI, D.; KAUL, B.; AMIM, S.; REDDY, B. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. **Chemico-biological Interactions**, Clare, v. 84, pp. 277-290, 1992.

RESENDE, F.; ALVES, J.; MUNARI, C.; SENEDESE, J.; SOUSA, J.; BASTOS, J.; TAVARES, D. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 634, pp. 112-118, 2007.

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M.; JORDÃO, B. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 3, pp. 464-468, 2005.

RUSSO, A.; TRONCOSO, N.; SANCHEZ, F.; GARBARINO, J.; VANELLA, A. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[a]pyrene and exogenous reactive oxygen species. **Life Sciences**, Elmsford, v. 78, pp. 1401-1406, 2006.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2, p. 1, pp. 33-38, 2005.

SCHELLER, S.; WILCZOK, T.; IMIELSKI, S. Free radical scavenging by ethanolic extract of propolis. **International Journal of Radiation Biology**, Londres, v. 57, pp. 461-465, 1990.

SIMÕES, L.; GREGÓRIO, L.; da SILVA FILHO, A.; de SOUZA, M.; AZZOLINI, A.; BASTOS, J.; LUCISANO-VALIM, Y. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, pp. 59-65, 2004.

SINGH, N.; McCOY, M.; TICE, R.; SCHNEIDER, E. A simple technique for quantification of low levels do DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 175, n. 1, pp. 184-191, 1988.

TAVARES, D.; BARCELOS, G.; SILVA, L.; TONIN, C.; BASTOS, J. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 20, pp. 1154-1158, 2006.

TEIXEIRA, E.; NEGRI, G.; MEIRA, R.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of Green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Journal of Oxford University Press**, Oxford, v. 2, n. 1, pp. 85-92, 2005.

VARANDA, E.; MONTI, R.; TAVARES, D. Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct and indirect-acting mutagens. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, New York, v. 191, pp. 403-413, 1999.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 2<sup>a</sup> Ed., 384f, 1984.

WOISKY, R.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, Londres, v. 37, n. 2, pp. 99-105, 1998.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Os resultados obtidos pelos testes realizados com *Allium cepa* indicaram que tanto o extrato etanólico de própolis verde quanto o extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* não induziram alterações celulares. Não foram verificadas frequências significativas de aberrações cromossômicas, de quebras cromossômicas e de micronúcleos nas células meristemáticas, nem frequência significativa de micronúcleos em células da geração F<sub>1</sub> de raízes de cebola. Esses dados foram confirmados pelos resultados obtidos pelos ensaios realizados com cultura de células de mamíferos (HTC), cuja frequência de micronúcleos e de danos genotóxicos não foi significativa, em relação ao teste controle negativo.

Foi observado, também, que os extratos testados foram capazes de reduzir os danos clastogênicos causados pelo MMS, tanto nas raízes de cebola, como nas células HTC mantidas em cultura.

Os testes com células de mamíferos são vastamente utilizados para testes de antigenotoxicidade e antimutagenicidade e são, portanto, válidos para este tipo de análise. Deste modo, comparando-se os resultados obtidos para os sistemas-teste de *A. cepa* e de cultura de células de mamíferos, é possível validar a utilização dos testes de aberrações cromossômicas e do micronúcleo em raízes de cebola, para testes de pré-tratamento de antimutagenicidade.

É interessante ressaltar que para fins de avaliação de efeitos de extratos de própolis e de sua origem botânica, há a necessidade da utilização de extratos

etanólicos produzidos pela mesma metodologia, pois a falta de padronização na obtenção dos extratos pode caracterizar em um problema por ocasião da comparação entre os efeitos obtidos por estes compostos. Outro fator importante foi a utilização de amostra de própolis verde e de amostra vegetal de *B. dracunculifolia*, planta encontrada na mesma região, onde a própolis verde é coletada.

Para uma caracterização química mais detalhada dos extratos, seria necessária uma avaliação mais apurada, como a obtida por estudos com cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Por esta metodologia seria possível quantificar com maior precisão o composto principal encontrado e assim, identificar melhor a ação celular promovida pelos extratos. Seria possível quantificar e isolar o composto principal, dos extratos, podendo utilizá-los em testes específicos, sem riscos de contaminação por outros compostos. Esta análise eliminaria as incertezas da ação sinérgica entre os constituintes dos extratos. Além disso, sabe-se que a quantificação dos flavonóides pela técnica do  $\text{AlCl}_3$  é considerada eficiente, porém, a quantidade de flavonóides pode ser subestimada, pois esta análise baseia-se em apenas uma classe dessas substâncias (MARCUCCI et al., 1998).

Estes resultados foram suficientes para verificar algumas propriedades protetoras dos extratos de própolis verde e do alecrim-do-campo, mas ainda são necessários estudos adicionais que possam esclarecer e comprovar a eficiência dos mecanismos protetores dos componentes dos extratos etanólicos da própolis e de *B. dracunculifolia*, para que estes sejam administrados aos humanos de forma segura e benéfica.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

---

Pelos resultados obtidos nos ensaios realizados com o extrato etanólico da própolis verde (EEPV) e com duas concentrações do extrato etanólico de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) (EEBD), com os sistemas-teste de *Allium cepa* e cultura de células HTC, pode-se concluir:

- O extrato etanólico da própolis verde, na concentração de 0,06 µL/mL, não possui potencial genotóxico e mutagênico para células meristemáticas de *A. cepa* nem para células HTC mantidas em cultura.
- O extrato etanólico do alecrim-do-campo, nas concentrações de 0,06 µL/mL e 0,30 µL/mL, não induziram genotoxicidade, nem mutagenicidade, no sistema-teste de *A. cepa* ou em células HTC.
- Avaliações de antigenotoxicidade e antimutagenicidade, realizadas com células meristemáticas de *A. cepa*, indicaram que tanto o EEPV, quanto as duas concentrações do EEBD foram capazes de inibir os efeitos clastogênicos do MMS.
- Para o sistema-teste de *A. cepa*, o EEBD mostrou um potencial antimutagênico maior que o EEPV, com uma porcentagem de redução de danos de 100%.
- Os ensaios de antimutagenicidade, realizados com cultura de células HTC, indicaram que o EEPV e o EEBD atuam como agentes desmutagênicos, por inativarem a ação do MMS.
- Para o sistema-teste de cultura de células HTC, o EEPV e o EEBD, quando expostos a um período prévio de incubação, apresentaram taxas maiores de antimutagenicidade, quando comparadas ao tratamento sem incubação.

➤ A espécie *A. cepa* e a cultura de células HTC caracterizaram-se em eficientes sistemas-teste para detecção dos efeitos antimutagênicos de extratos de própolis ou extratos vegetais.

➤ O sistema-teste de *A. cepa* caracterizou-se como uma ferramenta eficaz e sensível para ensaios de antigenotoxicidade e antimutagenicidade, podendo caracterizar-se em um novo sistema-teste para ensaios desta natureza.

## 7. REFERÊNCIAS GERAIS

---

ABALEA, V.; CILLARD, J.; DUBOS, M.-P.; SERGENT, O.; CILLARD, P.; MOREL, I. Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 1, pp. 1457-1466, 1999.

AFANAS'EV, I.B.; DOROZHKO, A.; BRODSKII, A.; KOSTYUK, A.; POTAPOVITCH, A. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 38, pp. 1763-1769, 1989.

AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 71, n.10, pp. 1397-1421, 2006.

AGULLO, G.; GAMET, L.; BESSON, C.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and CaCo-2 cells. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 87, pp. 55-63, 1994.

AGULLO, G.; GAMET-PAYRASTRE, L.; FERNANDEZ, Y.; ANCIAUX, N.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). **Cancer Letters**, Amsterdam, 105, pp. 61-70, 1996.

ALENCAR, S.; AGUIAR, C.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y.K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, pp. 909-915, 2005.

AMOROS, M.; SIMÕES, C.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. Synnergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture.

Comparison with antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 55, pp. 1732-1740, 1992.

AREIAS, F.M.; REGO, A.C.; OLIVEIRA, C.R.; SEABRA, R.M. Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/ $\text{Fe}^{2+}$ -induced oxidative stress in cultured retinal cells. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 62, pp. 111-118, 2001.

ASGARY, S.; NADERI, G.H.; SARRAFZADEGAN, N.; GHASSEMI, N.; BOSHTAM, M.; RAFIE, M.; AREFIAN, A. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 73, pp. 223-226, 1999.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, pp. 114-117, 2005a.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2, n. 1, pp. 29-31, 2005b.

BANKOVA, V.; CASTRO, S.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, Versailles, v. 30, pp. 3-15, 2000.

BANKSOTA, A.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 72, pp. 239-246, 2000.

BANKSOTA, A.; YASUHIRO, T.; SHIGETOSHI, K. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, Londres, v. 15, pp. 561-571, 2001.

BARNES, S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, pp. 777S-783S, 1995.

BAST, A.; HAENEN, G.R.M.M. The toxicity of antioxidants and their metabolites. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 11, pp. 251-258, 2002.

BAZO, A. The antimutagenic and anticarcinogenic effect of propolis in Wistar rats. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 1, p. 113, 2002.

BELLINI, M.; ANGELI, L.; MATUO, R.; TEREZAN, A.; RIBEIRO, L.; MANTOVANI, M. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 20, pp. 355-360, 2006.

BEUDOT, C.; MÉO, M.; DAUZONNE, D.; ELIAS, R.; LAGET, M.; GUIRAUD, H.; BALANSARD, G.; DUMÉNIL, G. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity

of forty-two 3-substituted flavones in the Ames test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 417, pp. 141-153, 1998.

BIAGGI, M.; TATEO, F.; PAGANI, L.; LUINI, M.; ROMERO, E. Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. **Microbiologica**, Italy, v. 13, pp. 207-213, 1990.

BIANCHI, J. **Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Malation, utilizando os sistemas teste de Allium cepa e células de mamíferos**. 165f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

BIEWENGA, G.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. **General Pharmacology**, Oxford, v. 29, n. 3, pp. 315-331, 1997.

BOER, J.; HOEIJMAKERS, H. Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, n. 3, pp. 453-460, 2000.

BOOTS, A.W.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 585, pp. 325-337, 2008.

BORELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, Milão, v. 73, pp. S53-S63, 2002.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, pp. 343-354, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Art. 83, inciso IV do Regimento Interno da Secretaria, aprovado pela Portaria Ministerial nº. 574**, de 8 de Dezembro de 1998.

BRUNE, M.; ROSSANDER, L.; HALLBERG, L. Iron absorption and phenolic compound: Importance of different phenolic structures. **European Journal of Clinical Nutrition**, Londres, v. 43, pp. 547-558, 1989.

BURDOCK, G. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, pp. 347-363, 1998.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 22, pp. 749-760, 1997.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Oxford, v. 72, pp. 722-725, 2008.

CASAGRANDE, F.; DARBON, J. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 e CDK1. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 61, pp. 1205-1215, 2001.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Milão, v. 73, n. 1, pp. S1-S6, 2002.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, 37, pp. 949-962, 1999.

CHAUHAN, L.K.S.; SAVENA, P.; GUPTA, S. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. **Environment and Experiment Botany**, Oxford, v. 42, pp. 181-189, 1999.

CHOI, J.; PARK, K.; MOON, S.; RHEE, S.; YOUNG, H. Antimutagenic effect of plant flavonoids in the *Salmonella* Assay System. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 17, n. 2, pp. 71-75, 1994.

CHRISTOV, R.; TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; BERTRAND, M. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 20, n. 6, pp. 531-536, 2006.

CODY, V. Crystal and molecular structure of flavonoids. In: CODY, V.; MIDDLETON, E. Jr.; HARBORNE, J.B.; BERTZ, A. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medical properties**, New York, Alan R. Liss, pp. 29-44, 1988.

COLEMAN, M.D.; FERNANDEZ, S.; KHANDERIA, L. A novel clinical monitoring method to evaluate a triple antioxidant combination (Vitamins E, C and  $\alpha$ -lipoic acid) in diabetic volunteers using in vitro methaemoglobin formation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 14, pp. 33-42, 2003.

COSTA, A. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Grilbenkian, 2ª Ed., v. 3, 1982.

COSTA, R.; DINIZ, A.; MANTOVANI, M.; JORDÃO, B. In vitro study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assay. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 118, pp. 86-93, 2008.

COULTATE, T.P. **Food: The Chemistry of its Components**. The Royal Society of Chemistry, 2ª Ed., pp. 137-149, 1990.

CRANE, E. **Bees and Beekeeping: Science, Practice and World Recourses**. Londres: Heinemann, 1988.

DAUER, A.; HENSEL, A.; LHOSTE, E.; KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (HepG2) using single cell gel electrophoresis. **Phytochemistry**, New York, v. 63, pp. 199-207, 2003.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian red propolis - chemical composition and botanical origin. **Advance Access Publication**, v. 5, n. 4, pp. 435-441, 2007.

DEPEINT, F.; GEE, J.; WILLIAMSON, G.; JOHNSON, I. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 61, pp. 97-103, 2002.

DESCHNER, E.; RUPERTO, J.; WONG, G.; NEWMARK, H. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 12, pp. 1193-1196, 1991.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, Elmsford, v. 65, pp. 337-353, 1999.

DOLL, R. The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. **Cancer Research**, Baltimore, v. 52, pp. 2024-2029, 1992.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: Potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, Araraquara, v. 28, n. 3, pp. 241-249, 2007.

DUGAS, A.J.; CASTANEDA-ACOSTA, J.; BONIN, G.C.; PRICE, K.L.; FISCHER, N.H.; WINSTON, G.W. Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: Structure-activity relationships. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, pp. 327-331, 2000.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, pp. 81-95, 2000.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W.; ZEIGER, E.; BONASSI, S. The human micronucleus project - an international collaborative study on the use of micronucleus technique for measuring DNA damages in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 428, pp. 271-283, 1999.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 88, pp. 252-259, 2007.

FIRUZI, O.; MLADENKA, P.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; SASO, L. Hypochlorite scavenging activity of flavonoids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Londres, v. 56, pp. 801-807, 2004.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lund, v. 102, pp. 99-112, 1985.

FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 402, pp. 151-158, 1998.

FLORA, S.; IZZOTTI, A.; RANDEATH, K.; RANDEATH, E.; BARTSCH, H.; NAIR, J.; BALANSKY, R.; Van SCHOOTEN, F.; DEGAN, P.; FRONZA, G.; WALSH, D.; LEWTAS, J. DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 366, pp. 197-238, 1996.

FRESHNEY, I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**, John Wiley & Sons, 5ª Ed., 2005.

FU, J.; XIA, Y.; ZHENG, Y. Antimutagenicity of propolis against some mutagens in vivo e in vitro. **Biomedical and Environmental Sciences**, Pequim, v. 17, pp. 469-475, 2005.

FUKUDA, M.; OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 54, n. 10, pp. 1465-1468, 2006.

FUNARI, C.; FERRO, V.; MATHOR, M. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 111, pp. 206-212, 2007.

GALLI, F.; PIRODDI, M.; ANNETTI, C.; AISA, C.; FLORIDI, E.; FLORIDI, A. Oxidative stress and reactive oxygen species. **Contributions to Nephrology**, s.n., v. 149, pp. 240-260, 2005.

GALVEZ, J.; CRUZ, J.; ZARZUELO, A.; CUESTA, F. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. **Pharmacology**, Basel, v. 51, pp. 127-133, 1995.

GHISALBERTI, E. Propolis: a review. **Bee World**, Cardiff, v. 60, pp. 59-84, 1979.

GRANT, W. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 99, pp. 273-291, 1982.

GRANT, W. Higher plant assays for the detection old chromosomal aberrations and gene mutations - a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, pp. 107-112, 1999.

GRUNBERBER, D.; BANERJEE, R.; EISINGER, K; OLTZ, E.M.; EFROS, L.; CALDWELL, M.; ESTEVEZ, V.; NAKANISHI, K. Preferential citotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia**, s.n., v. 44, pp. 230-232, 1988.

HAENEN, G.R.M.M.; ARTS, M.J.T.J.; BAST, A.; COLEMAN, M.D. Structure and activity in assessing antioxidant activity in vitro and in vivo: A critical appraisal illustrated with the flavonoids. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 21, pp. 191-198, 2006.

HAENEN, G.R.M.M.; PAQUAY, J.; KORTHOUWER, R.; BAST, A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 236, pp. 591-593, 1997.

HAENEN, G.R.M.M.R.R.M.; PAQUAY, J.B.; KORTHOUWER, R.E.; BAST, A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 236, pp. 591-593, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, s.n., v. 186, 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 18, pp. 125-126, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, pp. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 18, pp. 125-126, 1995.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 16, pp. 845-850, 1994.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 16, pp. 845-850, 1994.

HARA, Y.; LUO, S.; WICKRAMASINGHE, R.; YAMANISHI, T. Special issue on tea. **Food Reviews International**, New York, v. 11, pp. 371-542, 1995.

HARA, Y.; LUO, S.J.; WICKRAMASINGHE, R.L.; YAMANISHI, T. Special issue on tea. **Food Reviews International**, New York, v. 11, pp. 371-542, 1995.

HARBORNE, J. Flavonoids in the environment: Structure-activity relationships. In: CODY, V.; MIDDLETON, E. Jr.; HARBORNE, J.B.; BERTZ, A. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, cellular and medical properties**, New York, Alan R. Liss, pp. 17-27, 1988.

HARBORNE, J. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: CODY, V.; MIDDLETON, E.Jr.; HARBORNE, J.B.; BERTZ, A. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships**, New York, Alan R. Liss, pp. 15-24, 1986.

HARBORNE, J.; BAXTER, H.; MOSS, G. **Phytochemical dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants**, Londres: Taylor & Francis, 2<sup>a</sup> Ed., 1999.

HARBORNE, J.B. Flavonoids in the environment: Structure-activity relationships, In: CODY, V.; MIDDLETON, E. Jr.; HARBORNE, J.B.; BERTZ, A. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties**, New York, Alan R. Liss, pp. 17-27, 1988.

HARBORNE, J.B. Nature, distribution and function of plant flavonoids, In: CODY, V.; MIDDLETON, E. Jr.; HARBORNE, J.B.; BERTZ, A. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships**, New York, Alan R. Liss, pp. 15-24, 1986.

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H.; MOSS, G.P. **Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants**, Londres, Taylor & Francis, 2<sup>a</sup> Ed., 998, 1999.

HARISH, Z.; RUBINSTEIN, A.; GOLDNER, M.; ELMALIAH, M.; MIZRACHI, Y. Suppression of HIV-replication by propolis and its immunoregulatory effect. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, s.n., v. 23, pp. 89-96, 1997.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA - effects in single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 94, n. 1-2, pp. 183-188, 1997.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y.

Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 399, n. 2, pp. 125-133, 1998.

HEDDLE, J.; HITE, M.; JRKHART, B.; MACGREGOR, J.; SALAMONE, M. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 399, n. 2, pp. 125-133, 1983.

HEIJNEN, C.; HAENEN, G.R.M.M.; OOSTVEEN, R.; STALPERS, E.; BAST, A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. **Free Radical Research**, Londres, v. 36, 575-581, 2002.

HEIJNEN, C.; HAENEN, G.R.M.M.; VEKEMANS, J.; BAST, A. Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure-activity relationship. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 10, 199-206, 2001.

HEIJNEN, C.G.; HAENEN, G.R.M.M.; OOSTVEEN, R.M.; STALPERS, E.M.; BAST, A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. **Free Radical Research**, Londres, v. 36, pp. 575-581, 2002.

HEIJNEN, C.G.; HAENEN, G.R.M.M.; VEKEMANS, J.A.J.M.; BAST, A. Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure-activity relationship. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 10, pp. 199-206, 2001.

HERTOG, M.; HOLLMAN, P.; KATAN, M. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and nine fruits commonly consumed in The Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, pp. 2379-2383, 1992.

HERTOG, M.; HOLLMAN, P.; KATAN, M.; KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. **Nutrition and Cancer**, s.n., v. 20, n. 1, pp. 21-29, 1993a.

HERTOG, M.; HOLLMAN, P.; van de PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in tea infusions, wine and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 41, pp. 1242-1246, 1993b.

HORN, R.; VARGAS, V. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the salmonella/microsome assay. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 22, pp. 1043-1049, 2008.

HORVÁTHOVÁ, K.; CHALUPA, I.; SEBOVÁ, L.; TOTHOVÁ, D.; VACHÁLKOVÁ, A. Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 565, pp. 105-112, 2005.

HUANG, S.; FRANKEL, E.; GERMAN, J. Effect of individual tocopherols and tocopherol in mixtures on the oxidative stability of corn oil tryglicerides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, pp. 2345-2350, 1995.

ISLA, M.; NIEVA MORENO, M.; SAMPIETRO, A.; VATTUONE, M. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 76, pp. 165-170, 2001.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; HASEGAWA, A.; SHIBATA, M.; OGISO, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 70, pp. 343-347, 1983.

JAGETIA, G.; ARUNA, R. Correlation of micronuclei-induction with the cell survival in HeLa cells treated with a base analogue, azidothymidine (AZT) before exposure to different doses of gama-radiation. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 139, pp. 33-43, 2003.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G.O.; SLOWING, K.V.; THOMAS, C.F.; BEECHER, C.W.W. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, **Science**, Washington, v. 275, pp. 218-220, 1997.

JENG, S.; SHIH, M.; KAO, C.; LIU, T.; CHEN, S. Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, pp. 893-897, 2000.

KADA, T.; SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens - Their modes of action. **BioEssays**, Cambridge, v. 7, n. 3, pp. 113-116, 1987.

KANG, E. **Dietary flavonoids as protectors from ascorbate-induced oxidative stress *in vivo***. 101f. Dissertação (Mestrado em Farmácia e Nutrição), Universidade de Saskatchewan, Saskatoon, Canadá, 2007.

KIM, H.; SON, K.; CHANG, H.; KANG, S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, Tóquio, v. 96, pp. 229-245, 2004.

KNASMÜLLER, S.; STEINKELLNER, H.; MAJER, B.; NOBIS, E.; SCHARF, G.; KASSIE, F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, pp. 1051-1062, 2002.

KOPPEN, G.; TONCELLI, L.; TRIEST, L.; VERSCHAEVE, L. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. **Mechanisms of Ageing and Development**, Limerick, v. 110, pp. 13-24, 1999.

KORKINA, L.; AFANAS'EV, I.B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids, In: SIES, H. **Antioxidants in disease. Mechanisms and therapy. Advances in Pharmacology**. San Diego, Academic Press, 707 f., 1997.

KÜHNHAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. **World Review of Nutrition and Dietetics**, Basel, v. 24, pp. 117-191, 1976.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERJEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 64, pp. 235-240, 1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic regions. **Food Chemistry**, Oxon, v. 84, n. 3, pp. 329-339, 2004.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 51, n. 6, pp. 740-742, 2003.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 51, n. 6, pp. 740-742, 2003.

KUNT, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **European Journal of Nutrition**, s.n., v. 38, pp. 133-142, 1999.

KURODA, Y.; SHIMA, N.; YAZAWA, K.; KAJI, K. Desmutagenic and bio-antimutagenic activity of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in cultured Chinese hamster V79 cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 497, pp. 123-130, 2001.

KURZER, M.S. Hormonal effects of soy isoflavones: studies in premenopausal and postmenopausal women. **Journal of Nutrition**, v. 130, pp. 660-661, 2000.

LAI, L.; CHOU, S.; CHAO, W. Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, pp. 963-968, 2001.

LEE, H.C.; YIN, P.H.; LU, C.Y.; CHI, C.W.; WEI, Y.H. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. **The Biochemical Journal**, Londres, v. 348, pp. 425-432, 2000.

LEME, D.M.; de ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 88, pp. 214-219, 2008a.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 650, pp. 80-86, 2008b.

LIEN, E.J.; REN, S.; BUI, H.; WANG, R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, pp. 285-294, 1999.

LIMA, R. **Mecanismos de ação da própolis na modulação de danos quimicamente induzidos no DNA**. Tese (Doutorado em Patologia), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

LUGASI, A.; HÓVÁRI, J.; SÁGI, K.V.; BÍRÓ, L. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 47, n. 4, pp. 119-125, 2003.

LUSTOSA, S.; GALINDO, A.; NUNES, L.; RANDAU, K.; ROLIM NETO, P. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 3, pp. 447-454, 2008.

MA, T.H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNEL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, H.; ZHANG, H. An improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 334, pp. 185-195, 1995.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Versailles, v. 26, pp. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 5, pp. 529-536, 1996.

MARCUCCI, M.C.; BANKOVA, V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Current Topics in Phytochemistry**, Trivandrum, v. 2, pp. 116-123, 1999.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 74, pp. 105-112, 2001.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 46, 1998.

MARTÍNEZ-FLORES, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v. 17, n. 6, pp. 271-278, 2002.

MATKOWSKI, A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, pp. 548-560, 2008.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.; DIAS, A.; FONSECA, I.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 1, 2006.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential evaluation of the water of river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* system. **Cytologia**, Tóquio, v. 69, pp. 399-408, 2004.

MATSUMOTO, S.T.; RIGONATO, J.; MANTOVANI, M.; MARIN-MORALES, M.A. Evaluation of the genotoxicity potential due to the action of an effluent contaminated with chromium, by the comet assay in CHO-K1 cultures. **Caryologia**, Firenze, v. 58, n. 1, pp. 40-46, 2005.

MATSUO, M.; SASAKI, N.; SAGA, K.; KANEKO, T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 28, n. 2, pp. 253-259, 2005.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, pp. 405-411, 2005.

MENKE, M.; CHEN, I.; ANGELIS, K.; SCHIBERT, I. DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 493, pp. 87-93, 2001.

MENOLI, R.; MANTOVANI, M.; RIBEIRO, L.; SPEIT, G.; QUINZANI-JORDÃO, B. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on v79 cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 496, pp. 5-13, 2001.

MIDDLETON, E.J.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In: HARBORNE, J. **The Flavonoids: Advances in Research Since 1986**, Londres: Chapman and Hall, pp. 619-652, 1993.

MINAS GERAIS. Notícia de 10 de Maio de 2007. Acesso em 15 de Junho de 2009, disponível em Minas Online: <http://www.mg.gov.br/portalmg/do/noticias?op=estruturaConteudo&coConteudo=37587&opMenu=ultimas&pg=>

MITCHELMORE, C.; CHIPMAN, J. Detection of DNA strand breaks in brown trout *Salmo trutta* hepatocytes and blood cells using single-cell gel electrophoresis comet assay. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 41, pp. 161-182, 1998.

MIYAJI, C.; POERSCH, A.; RIBEIRO, L.; EIRA, A.; CÓLUS, I. Shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) extracts as a modulator of micronuclei induced in HEp-2 cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 20, pp. 1555-1559, 2006.

MORENO, M.; ZAMPINI, I.; ORDÓÑEZ, R.; JAIME, G.; VATTUONE, M.; ISLA, A. Evaluation of the citotoxicity, genotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of propolis from Tucuman, Argentina. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, pp. 8957-8962, 2005.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger's Principles of Biochemistry**, New York, Freeman, 4ª Ed., pp. 829, 2004.

NGUYEN, T.T.T.; TRAN, E.; ONG, C.K.; LEE, S.K.; DO, P.T.; HUYNH, T.T.; NGUYEN, T.H.; LEE, J.J.; TAN, Y.; ONG, C.S.; HUYNH, H. Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of MEK-MAPK. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 197, pp. 110-121, 2003.

O MERCADO. (2009). **Uniflora Health Foods**. Acesso em 15 de Junho de 2009, disponível em Uniflora Health Foods: <http://www.uniflora.ind.br/conteudo/omercado.asp>

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 504, pp. 17-36, 2002.

OLIVEIRA, A.; SHINOBU, C.; LONGHINI, R.; FRANCO, S.; SVIDZINSKI, T. Antifungal activity os propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, pp. 493-497, 2006a.

OLIVEIRA, R.; MATUO, R.; SILVA, A.; MATIAZI, H.; MANTOVANI, M.; RIBEIRO, L. Protective effect of B-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 21, pp. 41-52, 2007.

OLIVEIRA, R.; RIBEIRO, L.; da SILVA, A.; MATUO, R.; MANTOVANI, M. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action B-glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 20, pp. 1225-1233, 2006b.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.; AGUIAR, C. Botanical origin and chemical composition of brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, pp. 2502-2506, 2002.

PARK, Y.K.; FUKUDA, I.; ASHIDA, H.; NISHIUMI, S.; YOSHIDA, K.; DAUGSCH, A.; SATO, H.; PASTORE, G. Suppressive effects of ethanolic extrats of propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, pp. 10306-10309, 2005.

PARK, Y.K.; FUKUDA, I.; ASHIDA, H.; NISHIUMI, S.; YOSHIDA, K.I.; DAUGSCH, A.; SATO, H.H.; PASTORE, G.M. Suppressive effects of ethanolic extrats of propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, pp. 10306-10309, 2005.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.; ALCICI, N. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, pp. 313-318, 1998.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 58, pp. 2-7, 2000.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.; AGUIAR, C.; ALENCAR, S.; FUJIWARA, F. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 5, pp. 1100-1103, 2004.

PEDRO, J. **Deteccão da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, do inseticida fipronil no organismo teste *Allium cepa***. 103f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

PEREIRA, A.; ANDRADE, S.; SWERTS, M.; MAISTRO, E. First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, pp. 2580-2584, 2008.

PEREIRA, A.; SEIXAS, F.; AQUINO-NETO, F. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, pp. 321-326, 2002.

PETERSON, G. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, pp. 748S-789S, 1995.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 63, pp. 1995-2018, 1998.

PHILLIPS, B.; JENKINSON, P. Is ethanol genotoxic? A review of the published data. **Mutagenesis**, Oxford, v. 16, n. 2, pp. 91-101, 2001.

PIERPOINT, W.S. Flavonoids in the human diet, In: CODY, V.; MIDDLETON, E. Jr.; HARBORNE, J.B.; BERTZ, A. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships**, New York, Alan R. Liss, pp. 125-140, 1986.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, pp. 1035-1042, 2000.

RABELO-GAY, M.; RODRIGUES, M.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, 1991.

RANK, J.; LOPEZ, L.; NIELSEN, M.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* roots cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, Lunds, v. 136, pp. 13-18, 2002.

RANK, J.; NIELSEN, M. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, Lunds, v. 118, pp. 49-53, 1993.

RAO, C.; DESAI, D.; KAUL, B.; AMIM, S.; REDDY, B. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. **Chemico-biological Interactions**, Clare, v. 84, pp. 277-290, 1992.

RAO, C.; DESAI, D.; RIVENSON, A.; SIMI, B.; AMIN, S.; REDDY, B. Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate. **Cancer Research**, Baltimore, v. 55, pp. 2310-2315, 1995.

REINLI, K.; BLOCK, G. Phytoestrogen content of foods: A compendium of literature values. **Nutrition and Cancer**, s.n., v. 26, pp. 123-128, 1996.

RESENDE, F.A.; ALVES, J.M.; MUNARI, C.C.; SENEDESE, J.M.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; TAVARES, D.C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 634, pp. 112-118, 2007.

REZENDE, G.; PIMENTA, F.; COSTA, L. Antimicrobial activity of two Brazilian commercial propolis extracts. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, Piracicaba, v. 5, n. 16, pp. 967-970, 2006.

RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S.; SALVADORI, D.A. Brazilian natural dietary components (annatto, propolis and mushrooms) protecting against mutation and cancer. **Human & Experimental Toxicology**, Hampshire, v. 25, n. 5, pp. 267-272, 2006.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Trends and Plant Science**, New York, v. 20, pp. 933-956, 1996.

RIGONATO, J.; MANTOVANI, M.; JORDÃO, B. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 3, pp. 464-468, 2005.

ROBERTO, M.M. **Avaliação do potencial antimutagênico de extrato etanólico da própolis, por meio do sistema teste de *Allium cepa***. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 22, pp. 19-34, 2002.

ROUSSEFF, R.L.; MARTIN, S.F.; YOUTSEY, C.O. Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in citrus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 35, pp. 1027-1030, 1987.

RUSSO, A.; TRONCOSO, N.; SANCHEZ, F.; GARBARINO, J.; VANELLA, A. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[a]pyrene and exogenous reactive oxygen species. **Life Sciences**, Elmsford, v. 78, pp. 1401-1406, 2006.

SAHU, S.; GRAY, G. Kaempferol-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 85, pp. 159-164, 1994.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2, n. 1, pp. 33-38, 2005.

SASAKI, Y.F.; IZUMIYAMAF.; NISHIDATE, E.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S.; MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and alkaline single-cell gell electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 393, n. 1-2, pp. 133-139, 1997.

SAVOURET, J.F.; QUESNE, M. Resveratrol and cancer. A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 56, pp. 85-87, 2002.

SCAZZOCCHIO, F.; D'AURIA, F.; ALESSANDRINI, D.; PANTANELLA, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, Jena, v. 161, pp. 327-333, 2005.

SCHELLER, S.; WILCZOK, T.; IMIELSKI, S. Free radical scavenging by ethanolic extract of propolis. **International Journal of Radiation Biology**, Londres, v. 57, pp. 461-465, 1990.

SICHEL, G.; CORSARO, C.; SCALIA, M.; DI BILIO, A.J.; BONOMO, R.P. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O<sub>2</sub><sup>-</sup>. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 11, pp. 1-8, 1991.

SIES, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 91, n. 3, pp. S31-S38, 1991.

SIES, H.; CADENAS, E. Oxidative stress: Damage to intact cells and organs. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, Londres, v. 311, n. 1152, pp. 617-631, 1985.

SILVA, B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. Chemicam composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Advance Access Publication**, s.n., v. 5, n. 3, pp. 313-316, 2008.

SIMÕES, L.M.C.; GREGÓRIO, L.E.; da SILVA FILHO, A.A.; de SOUZA, M.L.; AZZOLINI, A.E.C.S.; BASTOS, J.K.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, pp. 59-65, 2004.

SINGH, N.; McCOY, M.; TICE, R.; SCHNEIDER, E. A simple technique for quantification of low levels do DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 175, n. 1, pp. 184-191, 1988.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 368, pp. 171-179, 1996.

SOUZA, T.; FONTANETTI, C. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 605, pp. 87-93, 2006.

STEELE, C.; LALIES, M.; IOANNIDES, C. Inhibition of the mutagenicity of aromatic amines by the plant flavonoid (+)-catechin. **Cancer Research**, Baltimore, v. 45, pp. 3573-3577, 1985.

SUGIHARA, N.; ARAKAWA, T.; OHNISHI, M.; FURUNO, K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linoleic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 27, pp. 1313-1323, 1999.

SWAIN, T. The evolution of flavonoids. In: CODY, V.; MIDDLETON, E.Jr.; HARBBORNE, J.B.; BERTZ, A. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships**, New York: Alan R. Liss, pp. 1-14, 1986.

TAKAHAMA, U. Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: Mechanism of antioxidative function. **Phytochemistry**, New York, v. 24, pp. 1443-1446, 1985.

TAPIERO, H.; NGUYEN, B.A.G.; TEW, K.D. Estrogens and environmental estrogens. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, 2002, v. 56, pp. 36-44, 2002a.

TAPIERO, H.; TEW, K.D.; NGUYEN BA, G.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 56, pp. 200-207, 2002b.

TAVARES, D.; BARCELOS, G.; SILVA, L.; TONIN, C.; BASTOS, J. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 20, pp. 1154-1158, 2006.

TEIXEIRA, E.; NEGRI, G.; MEIRA, R.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of Green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Journal of Oxford University Press**, Oxford, v. 2, n. 1, pp. 85-92, 2005.

TICE, R.; ANDREWS, P.; SINGH, N. The single cell gel assay. A sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In: B. SUTHERLAND, B.; WOODHEAD, A. **DNA damage and repair in human tissues**. New York: Plenum Press, 1990.

TICE, R.R.; AGURELL, R.; ANDERSON, D.; BURLISON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.-C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, pp. 206-221, 2000.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Advance Access Publication**, s.n., v. 3, n. 2, pp. 249-254, 2006.

UTESCH, D.; FEIGE, K.; DASENBROCK, J.; BROSCARD, T.H.; HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; LINES, T.C. Evaluation of the potential *in vivo* genotoxicity of quercetin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 654, pp. 38-44, 2008.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ÖNÇAG, Ö.; ÇOGULO, D.; GENÇAY, Ö.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, Jena, v. 160, pp. 189-195, 2005.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 160, pp. 1-40, 2006.

van ACKER, S.A.; van der BERG, D.J.; TROMP, M.N.; GRIFFOEN, D.H.; van BENNEKOM, W.P.; van der VIJGH, W.J.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 20, pp. 331-342, 1996.

VARANDA, E.; MONTI, R.; TAVARES, D. Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct and indirect-acting mutagens. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, New York, v. 19, pp. 403-413, 1999.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 90, pp. 42-51, 2008.

VERDI, L.; BRIGHETE, I.; PIZZOLATTI, M. The *Baccharis* genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, pp. 85-94, 2005.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPERS, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry "high-density brines". **Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 43, pp. 284-291, 2002.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, 2<sup>a</sup> Ed., 384f, 1984.

WATTENBERG, L. Chemoprevention of Cancer. **Cancer Research**, New York, v. 45, pp. 1-8, 1985.

WOISKY, R.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, Londres, v. 37, n. 2, pp. 99-105, 1998.

YANISHILIEVA, N.V.; KAMAL-ELDIN, A.; MARINOVA, E.M.; TONEVA, A.G. Kinetics of antioxidant action of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols in sunflower and soybean triacylglycerols. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 104, pp. 262-270, 2002.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R.T. Health aspects of functional grape seed constituents. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 15, pp. 422-433, 2004.

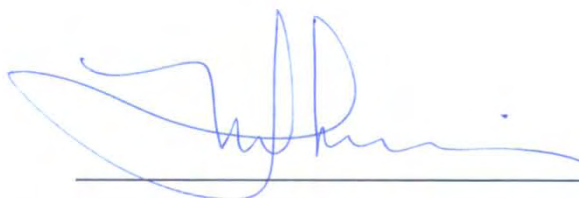
ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, pp. 5165-5170, 2001.

ZI, X.; GRASSO, A.W.; KUNG, H-J.; AGARWAL, R. A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. **Cancer Research**, Baltimore, v. 58, pp. 1920-1929, 1998.



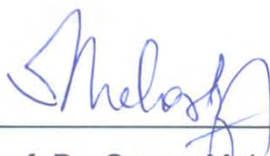
Matheus Mantuanelli Roberto

Aluno



Profª. Drª. Maria Aparecida Marin-Morales

Orientadora



Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-orientador

Rio Claro - SP

Julho/2009